



Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología

Laboratorio de Bioingeniería y Regeneración Tisular
Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga

Departamento de Cirugía Ortopédica y Traumatología
Hospital Costa del Sol
Facultad de Medicina, Universidad de Málaga

Tesis Doctoral

CAPACITACIÓN OSTEOGÉNICA *IN VITRO* DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA PARA SU APLICACIÓN EN RESECCIONES SEGMENTARIAS DE HUESO

Doctorando: Manuel Godino Izquierdo

Directores

Prof. Dr. José Antonio Andrades Gómez

Prof. Dr. Enrique Guerado Parra

Málaga, 2015





Publicaciones y
Divulgación Científica

AUTOR: Manuel Godino Izquierdo

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer
obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de
Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Facultad de Medicina

Departamento de Cirugía

Área de Ortopedia y Traumatología

D. Enrique GUERADO PARRA, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Madrid y Profesor Titular de Ortopedia y Traumatología de la Universidad de Málaga, vinculado como Director del Área Integrada de Cirugía Ortopédica, Traumatología y Rehabilitación del Hospital Universitario Costa del Sol,

CERTIFICA:

Que D. Manuel Godino Izquierdo, Licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad de Málaga, Médico Especialista en Cirugía Ortopédica y Traumatología, ha realizado bajo mi dirección el trabajo recogido por la presente Memoria de Tesis Doctoral titulada “Capacitación osteogénica in vitro de células madre mesenquimales de médula ósea para su aplicación en resecciones segmentarias de hueso” para la obtención del Título de Doctor en Medicina.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Málaga a 12 de Mayo de 2015.

Prof. Dr. Enrique Guerado Parra



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Facultad
de Ciencias *Departamento de Biología*
Celular, Genética y Fisiología **Área de**
Biología Celular

D. JOSÉ A. ANDRADES GÓMEZ, Doctor en Biología y Profesor Titular del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga,

CERTIFICA:

Que D. Manuel Godino Izquierdo, Licenciado en Medicina por la Universidad de Málaga, ha realizado bajo mi dirección el trabajo recogido por la presente Memoria de Tesis Doctoral titulada “Capacitación osteogénica *in vitro* de células madre mesenquimales de médula ósea para su aplicación en resecciones segmentarias de hueso” para la obtención del Título de Doctor en Medicina.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Málaga a 12 de Mayo de 2015.

José A. Andrades Gómez



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Facultad
de Ciencias *Departamento de Biología*
Celular, Genética y Fisiología **Área de**
Biología Celular

D. JOSÉ BECERRA RATIA, Director del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga,

INFORMA:

Que D. Manuel Godino Izquierdo, ha realizado en los laboratorios de este Departamento el trabajo experimental que ha permitido la elaboración de la presente Memoria de Tesis Doctoral.

Y para que así conste, firmo la presente en Málaga a 14 de mayo de 2015.

José Becerra Ratia

AGRADECIMIENTOS

Quería agradecer especialmente a mis directores de tesis, Enrique Guerado y José Antonio Andrades por su esfuerzo, por su tiempo y por su pasión por la investigación.

Gracias a José Becerra por su apoyo y abrirme las puertas del laboratorio LABRET.

Gracias a mis padres por su constante trabajo y esperanza de tener un hijo universitario y médico.

Gracias a Saúl, Lara, Aarón y Sonia por ser mi inspiración diaria, por su cariño y por su apoyo. Por todo el tiempo que les he robado, sin ellos esto no hubiera sido posible.

Gracias a Francisco Sendra por abrirnos el servicio de radiología del hospital Clínico para los estudios radiológicos.

Gracias a Carlos González por abrirnos el laboratorio del HCS.

Gracias a Paco Rivas por su apoyo estadístico.

A José y Ana

A Saúl, Lara, Aarón y Sonia

ÍNDICE

Capítulo I

RESUMEN	17
ABSTRACT	19
1. INTRODUCCIÓN	21
1.1 Generalidades	22
1.1.1 Osteobiología	22
1.1.2 Organización histológica de los huesos	26
1.1.3 Reparación ósea	28
1.2 Célula madre mesenquimal	32
1.2.1 Definición	32
1.2.2 Caracterización fenotípica	36
1.2.3 Fuente de células	39
1.2.4 Capacidad de proliferación y diferenciación	41
1.3 Biomateriales	44
1.3.1 Generalidades	44
1.3.2 Biomateriales como sustitutivos óseos	45
1.3.3 Cerámicas porosas inertes	46
1.4 Ingeniería tisular	48
1.4.1 Generalidades	48
1.4.2 Cultivo y terapia celulares	49
1.4.3 Factores de crecimiento	50
1.4.3.1 Factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β)	51

1.4.3.2 Proteína morfogenética de hueso (BMP)	52
1.5 Principios básicos de la osteosíntesis	54
1.6 Justificación del trabajo	57
 <u>Capítulo II</u>	
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	61
2.1 Hipótesis	62
2.2 Objetivos	63
2.2.1 Objetivo general	63
2.2.2 Objetivos específicos	63
 <u>Capítulo III</u>	
3. MATERIAL Y MÉTODOS	65
3.1 Obtención de la médula ósea (MO)	67
3.2 Aislamiento y cultivo de las células madre mesenquimales (MSCs)	67
3.3 Caracterización de las MSCs	69
3.3.1 Citometría de flujo	69
3.3.2 Capacidad condro/osteogénica de las células	71
3.4 Análisis bioquímicos	72
3.5 Implantación celular	74
3.6 Grupos experimentales	75

3.7 Procedimiento quirúrgico	77
3.7.1 Procedimiento anestésico	77
3.7.2 Técnica quirúrgica	77
3.8 Estudio radiográfico	81
3.9 Protocolo <i>postmortem</i>	82
3.10 Tratamientos de datos y análisis estadístico	83
3.10.1 Tamaño muestral	83
3.10.2 Análisis estadístico de los datos	84
3.10.3 Interpretación radiográfica	84
 <u>Capítulo IV</u>	
4. RESULTADOS	86
4.1 Caracterización de las células de médula ósea	86
4.1.1 Cultivo celular adherente	86
4.1.2 Cultivo celular en gel de colágeno (3D ó TRAP)	90
4.2 Implantes ectópicos	95
4.3 Implantes femorales	99
4.4 Estadística	113

<u>Capítulo V</u>	
5. DISCUSIÓN	126
<u>Capítulo VI</u>	
6. CONCLUSIONES	144
<u>Capítulo VII</u>	
7. BIBLIOGRAFÍA	146
<u>Capítulo VIII</u>	
8. ABREVIATURAS	160
<u>Capítulo IX</u>	
9. APÉNDICE	164
<u>Capítulo X</u>	
10. PUBLICACIONES/COMUNICACIONES Y PATENTE	173

Capítulo I

RESUMEN

Hasta ahora el mejor sustituto óseo es el autoinjerto, por su celularidad, osteoinducción y osteoconducción, pero presenta el problema de lo limitado en cuanto a la cantidad disponible, así como a la morbilidad que genera su extracción. En su lugar, usamos el aloinjerto, por su osteoinducción y osteoconducción, aunque, biológicamente, está muy limitado por su falta de celularidad y la menor osteoinducción que se le atribuye.

La Ingeniería Tisular ofrece una posibilidad, que puede constituirse en alternativa, para la producción de tejido óseo. En este trabajo se emplean células troncales mesenquimáticas de médula ósea de rata singénica, se aíslan, amplifican e inducen hacia el linaje osteogénico, siguiendo una estrategia metodológica de capacitación de células llamada “TRAP”. Una vez obtenidas las células, se adsorben en un transportador, un bloque de hidroxipatita, y se implantan en un modelo biomecánico de resección segmentaria de fémur de rata de 5 mm de longitud. A continuación, se estabiliza el sistema con una placa de osteosíntesis de 1.5 mm con cuatro tornillos corticales.

Se tratan cuatro grupos de animales: en el primero, el espacio del defecto se rellena con un aloinjerto de 5 mm de longitud. El segundo se ocupa con el bloque de hidroxipatita sin células. En el tercero, la lesión se trata con el bloque de hidroxipatita con células en cultivo primario (cultivo adherente). Finalmente, el cuarto grupo experimental corresponde al bloque de hidroxipatita con células osteoinducidas mediante el “TRAP”. Para la evaluación de los resultados, se realiza un estudio histológico, radiográfico

Como resultados, el aloinjerto (Grupo I) se ha comportado con una buena consolidación y no se ha producido rotura de las placas de osteosíntesis. El grupo de la hidroxipatita sola (Grupo II), sólo mostró tejido fibroso y no óseo, con rotura de todas las placas de osteosíntesis. El grupo de

hidroxiapatita con células mesenquimáticas osteoinducidas (Grupo III) mostró tejido óseo en todos los animales, con una incidencia escasa en la rotura de las placas, mientras que en los animales tratados con las células capacitadas mediante el “TRAP” (Grupo IV) los resultados con consolidación ósea fueron equivalentes al grupo anterior, pero no se produjo rotura en ninguna placa de osteosíntesis. Como conclusión, indicar que, en el modelo animal y quirúrgico seguido en este Tesis, la terapia celular con células mesenquimáticas, capacitadas en un cultivo celular 3D, produce tejido óseo y asegura la permanencia de la estabilización mecánica realizada en un modelo de resección segmentaria ósea murino.

ABSTRACT

ABSTRACT

So far, autograft is the gold standard for bone loss substitution. Autograft holds bone cells, has physiologic porosity for osteoconductivity and also contains proteins for bone induction. Nevertheless, autograft harvesting can provoke local and general complications. Furthermore, autograft collected from any human donor site may be scarce for therapeutic purposes. In some instances, allograft can be an alternative to autograft, although it contains no cells and its osteoinduction potential is limited.

Tissue engineering has become a very promising working line for bone cells availability and its subsequent use for bone repairing therapy. Tissue engineering consists of bone and growth factors handling for tissue or organs restoration. In this research mesenchymal stem cells (MSCs) are

isolated from syngeneic rats bone marrow. They are amplified and induced to an osteogenic line according to a so-call “trap” - an osteogenic capacitation model-.

Once MSCs are differentiated to bone forming lineage they are carried within a 5 mm³ hydroxyapatite block and transferred to an already prepared same size gap in a rat femur bone model. The construct is synthetized by a 1.5 mm osteosynthesis plate purchased to bone with four 1.5 mm cortical bone screws.

Four groups were operated on. The first one underwent a 5mm long allograft within the bone gap. The second one received a cell-less hydroxyapatite block; the third also a hydroxyapatite block embedded with cells obtained from a primary culture, and the forth one with a osteocommitted trap-cultured cells embedded hydroxyapatite block.

Radiographies and histological studies were carried out.

Allograft group showed bone fusion without plate breakage. Pure hydroxyapatite group presented fibrous tissue growth, but no bone bridging; also in this group all plates became broken. Hydroxyapatite MSCs embedded group showed bone tissue in all cases. And, at the end, hydroxyapatite bone committed MSC from the trap also showed bone fusion with plates in a very good condition.

We concluded that, in a murine model, committed MSCs in a 3D design therapy promotes bone fusion avoiding autograft harvesting.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

El desarrollo dinámico, tan característico de nuestras sociedades modernas, nos ha permitido aspirar a un aumento de nuestras expectativas de vida, hecho que nos expone a mayores posibilidades de padecer accidentes de magnitud significativa. Asimismo, el envejecimiento progresivo de nuestra población se ha visto acompañado por un notable incremento de las afecciones articulares degenerativas que requieren de sustitución protésica, con sus correspondientes recambios. Además, los traumatismos de alta energía nos enfrentan a complejas fracturas esqueléticas cuya resolución suele ser muy demandante. Estos sucesos comprometen directamente al aparato locomotor, especialmente al tejido óseo, provocando fracturas, pseudoartrosis y, a veces, importantes defectos óseos que precisan de hueso o sustitutivos óseos (Sakellariou y cols., 2014).

1.1.1 Osteobiología

El tejido óseo es una variedad de tejido conjuntivo que se caracteriza por su rigidez y su gran resistencia tanto a la tracción como a la compresión. Está formado por células (osteoblastos y osteocitos) y por una matriz ósea, constituida por un componente orgánico en un 30%, otro inorgánico en un 45% y un 25% restante de agua. La matriz orgánica está formada por colágeno tipo I en un 90%, y el resto por proteoglucanos y glucosaminoglucanos. La matriz inorgánica, primero no calcificada (osteóide), se calcifica atrapando sus células en el interior, y está constituida por un mineral, la hidroxiapatita, formada por fosfato/carbonato cálcico. Estos minerales de calcio le dan al hueso su rigidez y dureza (Clarke B., 2008).

Los osteoblastos son células poliédricas con largas y delgadas prolongaciones citoplasmáticas, que son rodeadas por el osteoide producido, y que se asocian mediante uniones de comunicación (*nexus* o *gap junctions*) con prolongaciones similares de los osteoblastos vecinos.

Los osteoblastos son células diferenciadas que sintetizan el colágeno y el osteoide. Los osteoblastos, cuando están en plena actividad, tienen forma cuboide, con un citoplasma basófilo, que refleja su ergastoplasma muy desarrollado, así como un prominente aparato de Golgi. Son células polarizadas que vacían sus productos de secreción por la zona del citoplasma en contacto con la matriz ósea ya formada anteriormente, (matriz intercelular preósea u osteoide).

Los osteoblastos participan también en el proceso de mineralización de la matriz orgánica, ya que producen vesículas de matriz, de unos 100 nm de diámetro, rodeadas de membrana celular, que acumulan iones Ca^{++} y PO_4^- , y son ricas además en fosfatasa alcalina y pirofosfatasa, enzimas capaces de generar iones PO_4^- , elevando su concentración en el medio extracelular, y creando centros de nucleación para el depósito de las sales minerales. Los osteoblastos tienen dos destinos posibles: ser rodeados por la matriz ósea que producen, pasando a ser osteocitos, o permanecer en la superficie del tejido óseo recién formado, aplanándose y constituyendo las células de revestimiento óseo (Lin y cols., 2011).

Los osteocitos son las células propias del tejido óseo maduro. Su citoplasma presenta ergastoplasma, aparato de Golgi y puede presentar lisosomas. Son capaces de sintetizar y de reabsorber, en forma limitada, a componentes de la matriz ósea (osteolisis osteocítica), procesos que tienen importancia en la regulación de la calcemia. Cada osteocito, bañado por una delgada capa de líquido tisular, ocupa su laguna y proyecta sus

prolongaciones citoplasmáticas por los canalículos, dentro de los cuales, toma contacto con prolongaciones de osteocitos vecinos mediante uniones de comunicación, o con células de revestimiento óseo bañadas por el líquido tisular del tejido conjuntivo que rodea a los capilares sanguíneos (Bonewald, 2007).

Las células intermedias, entre osteoblastos y osteocitos, son las células de revestimiento, con fenotipo aplanado, que revisten las superficies óseas del interior de los huesos, y en su mayor parte corresponden a osteoblastos inactivos y se comunican a través de nexos con las prolongaciones de los osteocitos.

Los osteoclastos se originan por fusión de monocitos que han abandonado la sangre circulante, por lo que pertenecen, de hecho, al sistema de fagocitos mononucleares. Son células móviles, de gran tamaño, multinucleadas, y se localizan adosadas a la superficie de tejido óseo que debe ser reabsorbido. Contienen numerosos lisosomas y en la superficie del osteoclasto que está en contacto con la matriz a reabsorber, se distinguen dos zonas distintas : un anillo externo o zona clara que corresponde a una especialización de la superficie celular en que la membrana se asocia estrechamente al hueso que delimita el área que se va a reabsorber, y la región central o borde estriado que presenta profundos repliegues de la membrana celular, bajo los cuales se concentran gran cantidad de lisosomas y mitocondrias, además de ergastoplasma y cisternas del Golgi.

La membrana de los lisosomas primarios se fusiona con la membrana celular que reviste a los repliegues del borde festoneado, liberando las enzimas lisosomales hacia el exterior y produciendo una acidificación del microambiente que baña el tejido óseo a reabsorber. El borde festoneado contiene además gran cantidad de vesículas endocíticas y lisosomas

secundarios, indicando que ocurre además un proceso de fagocitosis del material parcialmente solubilizado por el ambiente ácido y la acción lítica de las enzimas lisosomales (Takeshita y cols., 2013).

La matriz intercelular es una sustancia orgánica, u osteoide, que corresponde al 50% del peso seco del hueso. Más del 90% de ella corresponde a fibrillas de colágeno I, organizadas en laminillas de unos 5 μm de grosor. En cada laminilla ósea, las fibrillas colágenas se disponen paralelas entre sí, pero las laminillas sucesivas alternan ordenadamente la orientación de sus fibrillas en ángulos rectos. Esta disposición alternada de las fibrillas colágenas en laminillas sucesivas destaca particularmente al observar cortes de hueso con microscopía de luz polarizada.

El resto de los componentes orgánicos son principalmente glucoproteínas como la osteonectina, proteínas ricas en ácido g-carboxiglutámico, como la osteocalcina, y proteoglucanos de condroitín y queratán-sulfato. Son moléculas ricas en grupos ácidos, con gran tendencia a asociarse entre sí, capaces de unirse a calcio y juegan un papel importante en el proceso de mineralización de la matriz ósea.

Las sales minerales inorgánicas depositadas en el osteoide, le confieren al tejido óseo su rigidez y dureza, y actúan como una reserva de componentes minerales, sensible a estímulos endocrinos. Las más abundantes son el fosfato de calcio amorfo, y los cristales de hidróxidos de calcio y de fosfato, llamados hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Los cristales de hidroxiapatita son aplanados (30 nm por 3 nm) y se adosan a lo largo de las fibrillas colágenas, a intervalos de unos 67 nm. La superficie del cristal está hidratada y existe una vaina de agua e iones rodeándolo, lo que facilita el intercambio de iones entre el cristal y el líquido intersticial (Welsch, 2014).

1.1.2 Organización histológica de los huesos

En un hueso ya formado la disposición de los componentes del tejido óseo en cada zona del mismo está en estricta relación con las fuerzas de tracción y compresión a la que esa zona está sometida habitualmente. Sin embargo, el tejido óseo que se forma primero en el feto, y luego en los huesos en desarrollo, no se dispone de acuerdo a estos requerimientos mecánicos, sino que constituye un tejido óseo de base, llamado hueso primario o reticular ("entrelazado"), que posteriormente será reemplazado por el hueso secundario o laminar.

La principal diferencia entre el hueso reticular y el laminar radica en la disposición de las fibrillas de colágeno I, las cuales en el hueso primario se disponen en forma de manojos en forma irregular. De acuerdo al aspecto macroscópico que presentan se distinguen dos tipos de huesos: hueso cortical, formado por tejido óseo compacto, y hueso esponjoso, en el cual el tejido óseo se dispone en trabéculas que delimitan cavidades, en las que se ubica normalmente la médula ósea. En las superficies articulares la capa cortical de hueso compacto está cubierta por una capa de cartílago hialino, el cartílago articular, mientras que el resto de la superficies del hueso están cubiertas por membranas de tejido conjuntivo que forman el periostio y el endostio, en los que existen abundantes vasos sanguíneos que se adosan ya sea a las trabéculas del hueso esponjoso o que penetran en el hueso cortical compacto a través de los conductos de Volkman y de Havers (Reznikov y cols., 2014).

El hueso esponjoso está formado por delgadas trabéculas, que, en los huesos ya formados, corresponden a tejido óseo laminar, rodeadas por células de revestimiento óseo. Los osteocitos de las trabéculas óseas se mantienen desde los capilares sanguíneos vecinos ubicados en la médula

ósea. La orientación de cada trabécula y la disposición de sus laminillas óseas mineralizadas están determinadas por las tensiones mecánicas locales, con el objeto de resistir las compresiones y las tensiones a que es sometida. Si cambia la dirección de los requerimientos mecánicos recibidos por una trabécula (aumento de peso del individuo, crecimiento u otro) ella debe cambiar su orientación. El cambio en la forma de una trabécula se realiza mediante dos procesos coordinados, que ocurren en zonas precisas de la trabécula a remodelar: por un lado, crecimiento por aposición de la trabécula, por acción de los osteoblastos, que depositan laminillas sucesivas de tejido óseo en la zona en que existe un requerimiento mecánico, y por otro, reabsorción del tejido óseo de la trabécula por acción de los osteoclastos en los sitios en que no está sometido a tracción ni compresión (Welsch, 2014).

En la diáfisis de los huesos largos el tejido óseo laminar se organiza en tres formas distintas, formando los: sistemas de Havers, sistemas laminares intersticiales, y sistemas circunferenciales externo (subperióstico) e interno (subendóstico).

La osificación se desarrolla siempre por sustitución de un tejido conjuntivo preexistente, existiendo dos formas de osificación: la osificación intramembranosa es la forma en la cual el feto forma básicamente los huesos planos. Tiene lugar a partir de condensaciones de tejido mesenquimático muy vascularizado en las cuáles ciertas células mesenquimáticas se dividen, formándose el blastema óseo. A partir de estas células se forman los osteoblastos, que sintetizan y secretan al osteoide el cual posteriormente se mineraliza, y que va englobando a los osteoblastos, que se transforman en osteocitos. Las trabéculas de hueso primario así formada son posteriormente remodeladas de acuerdo al hueso al que pertenezcan (Percival y cols., 2013).

La osificación endocondral es la forma en la cual el feto forma los huesos largos y cortos. El proceso se produce de la siguiente forma: en primer lugar, se desarrolla un modelo cartilaginoso, que adopta una forma parecida a la del hueso que va a dar origen y que está rodeado de su pericondrio. A continuación, en la zona media de la diáfisis, se desarrollan en el pericondrio células osteoprogenitoras, y de ellas se originan osteoblastos, los cuales producen un collar óseo subperióstico mediante un proceso de osificación directa o membranosa. Simultáneamente en el cartílago subyacente, aparecen modificaciones similares a las descritas previamente en el cartílago epifisario, formándose un centro de osificación endocondral primario (diafisario). Las espículas óseas formadas sobre restos de la matriz cartilaginosa calcificada se unen al mango de hueso cortical, que sigue engrosándose a partir de la capa osteógena del periostio.

Posteriormente, se forman centros de osificación secundaria a nivel del cartílago de las epífisis, a partir del cual se formará el hueso esponjoso, cesando primero la osificación endocondral del cartílago hacia las epífisis.

El cartílago que permanece constituye la placa cartilaginosa epifisaria o cartílago de crecimiento de los huesos ya formados.

1.1.3 Reparación ósea

Cuando el tejido óseo sufre una agresión o se produce una fractura, se pone en marcha un proceso de reparación que conduce a la reposición de la estructura y función perdidas. La reparación ósea es más que un proceso de cicatrización normal, donde el tejido repuesto posee una pobre organización. Es un auténtico proceso regenerativo en el que se ponen en marcha una serie compleja de factores endógenos y exógenos que conducen a la formación de un blastema de reparación por activación de células madre que formarán un callo en la zona de la fractura, que

finalmente dejará la estructura reparada en forma y tamaño. El proceso tal como hoy lo conocemos es una cascada de acontecimientos celulares y moleculares perfectamente orquestada.

El proceso de reparación de fracturas o de incorporación de injertos, ambos englobados dentro del concepto de osteogénesis (formación de hueso), constituye una recapitulación de los eventos embrionarios que incluye una compleja interacción de los factores reguladores con las células y la matriz. La osteogénesis da lugar a la regeneración de una estructura ósea que fisiológica y biomecánicamente es idéntica al hueso original.

La osteogénesis está constituida por cinco fases: inflamación, vascularización, osteoinducción, osteoconducción y remodelación. La inflamación dura alrededor de dos semanas en el caso de los autoinjertos y mucho más en los aloinjertos. La vascularización se caracteriza por la aparición de blastemas vasculares que desde el lecho invaden el injerto. En esta fase pueden aparecer los fenómenos antigénicos de sensibilización en el caso de los aloinjertos, además de verse interrumpido el proceso de vascularización debido a infección, inflamación excesiva u otras causas. Con la vascularización, llegan las células pluripotenciales (MSC) que se diferencian a osteoblastos y representan el tercer estadio, la osteoinducción, que aparece por encima de las 3 semanas. La diferenciación de las MSC a osteoblastos se estimula mediante unas proteínas conocidas como BMP, responsables de la osteoinducción. Estas proteínas entran dentro del gran grupo conocido como factores de crecimiento (FC) (Andrades y cols., 2001c, 2003). Tanto la osteoinducción como la remodelación duran varios meses en el autoinjerto esponjoso pero pueden durar varios años en el hueso cortical y, sobre todo, en el aloinjerto (Einhorn y cols., 1998).

Cuando se precisa una regeneración esquelética como la reparación de una fractura, la respuesta inflamatoria activa unas reacciones en cadena de tal manera que la lesión vascular en la zona de fractura provoca la extravasación así como una serie de señales celulares. Las estirpes celulares sanguíneas, del tejido conectivo y los diferentes factores de crecimiento segregados o inducidos por unos u otros tipos celulares (PDGF, TGF- β y bFGF) participan en el proceso (Stein y cols., 1993).

A los 3-5 días de haberse producido la fractura se desarrolla un blastema que consiste en un conjunto de nuevos vasos sanguíneos, células (madre mesenquimáticas, fibroblastos y macrófagos) e isotipos de colágeno. La adhesión selectiva de los factores de crecimiento a los distintos tipos de colágeno puede localizar, proteger y posicionar temporalmente a estos factores con el fin de optimizar las interacciones celulares. De esta manera, el componente colágeno del tejido en reparación constituye un sustrato clave que permite la adhesión de los factores de crecimiento y las BMP a las células receptoras. La influencia biológica de las BMP en la diferenciación celular es de particular interés en relación con la formación de tejido óseo. El proceso final de remodelación ósea posterior a la reparación es dirigido por los osteoblastos y osteoclastos (Yang y cols., 1990).

Hay situaciones patológicas que de una u otra forma desvían en todo o en parte el proceso de regeneración ósea, de manera que, o no tiene lugar o lo hace demasiado lenta o anormalmente. En estos casos, la cirugía actual adopta soluciones que tratan de mitigar los problemas: autoinjertos, aloinjertos, materiales osteoconductores, prótesis artificiales, etc. Pero en cada uno de estos casos existen problemas que pueden tener un origen y una respuesta diferente. Actualmente, ni siquiera puede ofrecerse solución alguna en el caso de enfermedades genéticas.

Todos los problemas que suponen deficiencias en la osificación, salvo los de origen genético, pueden relativizarse a una falta o deficiencia de células madre o a la falta de algún factor bioactivo, que regule alguno de los pasos del proceso. De todas las posibles alteraciones que se contienen en esas dos causas generales, hoy sólo sabemos con certeza, que el número de células madre del linaje osteogénico disminuye drásticamente con la edad (Caplan y cols., 1991) El aumento de la esperanza de vida hace más importante si cabe el avance en este campo.

El tratamiento estándar para paliar dicho déficit óseo ha sido el autoinjerto que ha sido extraído de muchas localizaciones, aunque la zona donante más frecuente y que mayor cantidad proporciona es el hueso iliaco. El autoinjerto es osteoconductor (permite que las células osteoformadoras se desarrollen a través de él), osteoinductor (estimula la formación de nuevo hueso) y osteogénico (él mismo provee osteoblastos y facilita la consolidación). Tiene el inconveniente que su aporte es limitado y con alta morbilidad en la zona donante, donde se incluye la infección, la fractura del hueso iliaco, la herniación abdominal, la hemorragia y dolor crónico, entre otras (Kim y cols., 2009).

Como alternativa al autoinjerto se puede utilizar el aloinjerto que es un injerto extraído de un donante, que se implanta en un receptor perteneciente a la misma especie, pero con distinto genotipo. El aloinjerto se puede obtener de donantes vivos, como en el caso de las cabezas femorales extraídas en las artroplastias de cadera, de donantes multiorgánicos o de donantes de tejidos. Para su conservación se pueden emplear métodos de congelación, criopreservación o liofilización.

Entre las ventajas de los aloinjertos destacan su amplia disponibilidad, que depende del estocaje de los bancos de tejidos, su reducida inmunogenicidad

y su buena tolerancia por parte del receptor. Sin embargo, presentan como inconvenientes un comportamiento biológico inferior al del autoinjerto óseo, un elevado costo de mantenimiento, el riesgo de infección, una mayor incidencia de fracturas y la posibilidad de transmisión de enfermedades como SIDA, hepatitis, leucemia, tuberculosis, sífilis, cáncer y encefalopatía de Creutzfeldt-Jakob, entre otras (Tomford y cols., 1995, Mroz y cols., 2008).

1.2 Célula madre o troncal mesenquimal

1.2.1 Definición

Las células madre son células indiferenciadas caracterizadas por la capacidad de proliferar manteniendo su fenotipo y el potencial de diferenciación hacia distintos tipos celulares. Esto sugiere que las células madre pueden regenerar tejidos de órganos dañados, constituyendo así un posible tratamiento terapéutico para enfermedades que en la actualidad no tienen cura.

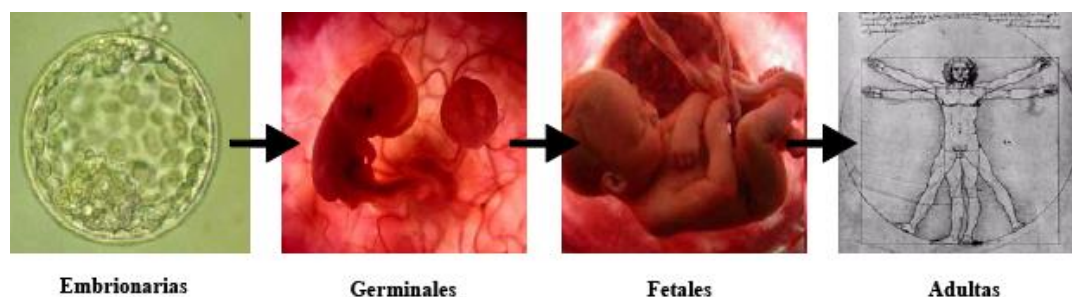


Figura 1. Tipos de células madre humanas. Desde el cigoto hasta el adulto, en todos estos estadios del desarrollo humano están presentes las células madre.

Existen distintos tipos de células madre, cuya capacidad de proliferación y de diferenciación celular disminuye con el desarrollo (Figs. 1 y 2):

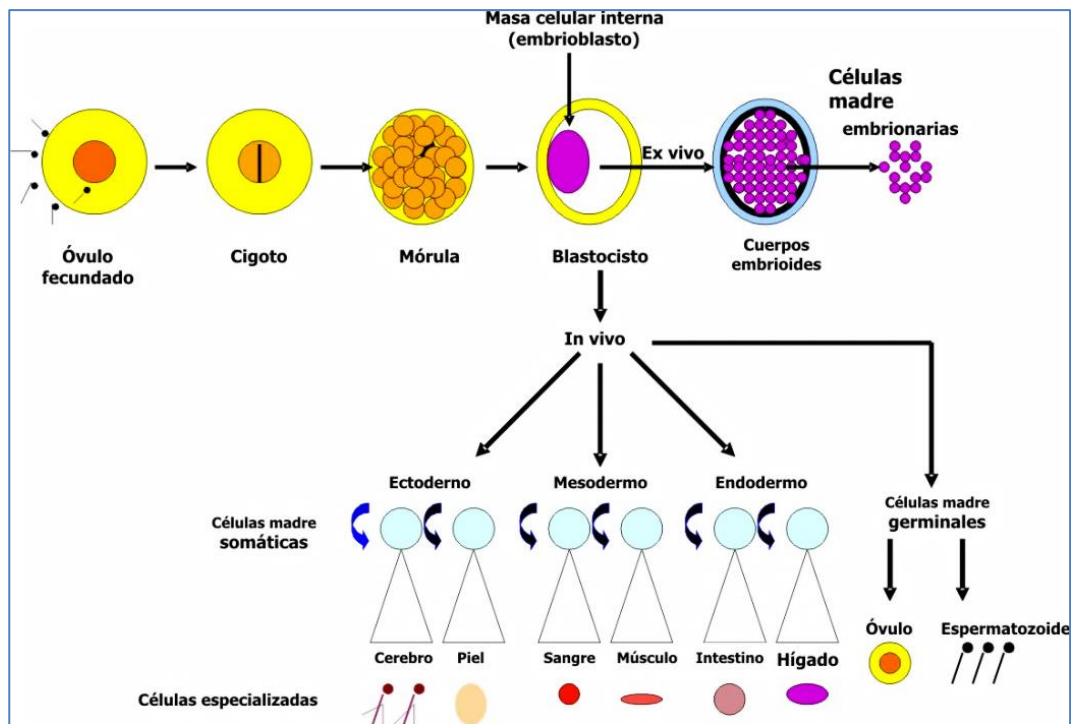


Figura 2. Esquema simplificado de la generación de células madre embrionarias y somáticas.

- Las células madre embrionarias se obtienen a partir del blastocisto, en la masa celular interna y presentan una mayor capacidad de proliferación y diferenciación celular.
- Las células madre germinales se aíslan de la cresta germinal de fetos y tienen menor capacidad de proliferación y diferenciación que las anteriores.
- Las células madre fetales son aquellas obtenidas a partir de la octava semana del desarrollo, momento en el que el embrión ya se considera feto. Estas células presentan menos multipotencialidad que las embrionarias y germinales, pero más que las adultas. Una ventaja de su uso es que provocan menos debate ético, ya que pueden ser aisladas de fetos cuyo

desarrollo ha sido interrumpido por razones médicas o debido a un aborto natural (Weissman y col., 2001).

Estas células, definidas hasta aquí, tienen la capacidad de diferenciarse en tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias.

d. Las células madre adultas se encuentran en una gran cantidad de tejidos del organismo de individuos adultos. Poseen las características de auto-renovación y diferenciación, pero a diferencia de las embrionarias, se considera que su capacidad proliferativa y su potencial de diferenciación (plasticidad) es menor.

Se pensaba que las células madre adultas estaban predeterminadas a diferenciarse a un tipo celular procedente de su mismo tejido de origen, o al menos de su capa embrionaria, como las células de músculo esquelético que muestran capacidad osteogénica o las células de la médula ósea que pueden diferenciarse a músculo esquelético. Esta idea ha sido revisada por grupos de investigación, sugiriendo que las células troncales adultas son capaces de diferenciarse funcionalmente a células especializadas procedentes de capas embrionarias distintas a las de su origen. Este fenómeno, denominado transdiferenciación, no está exento de controversia, dado que algunos lo justifican como fenómenos de fusión celular.

e. Actualmente, una tecnología emergente de terapia celular es la de las células madre pluripotentes inducidas (*induced pluripotent stem (iPS) cells*). Es decir, inducir un estado de pluripotencia en las células somáticas mediante reprogramación (Chakraborty y cols., 2010). Esta nueva tecnología podría ser utilizada en biología básica, desarrollo de medicamentos y trasplante, pero la integración de retrovirus en las células para conseguir iPS provoca el aumento del riesgo de tumores (Trippel y cols., 2004).

Dentro de las células madre adultas, se encuentran las células madre hematopoyéticas, neurales, epiteliales y mesenquimales. (Figura 3)

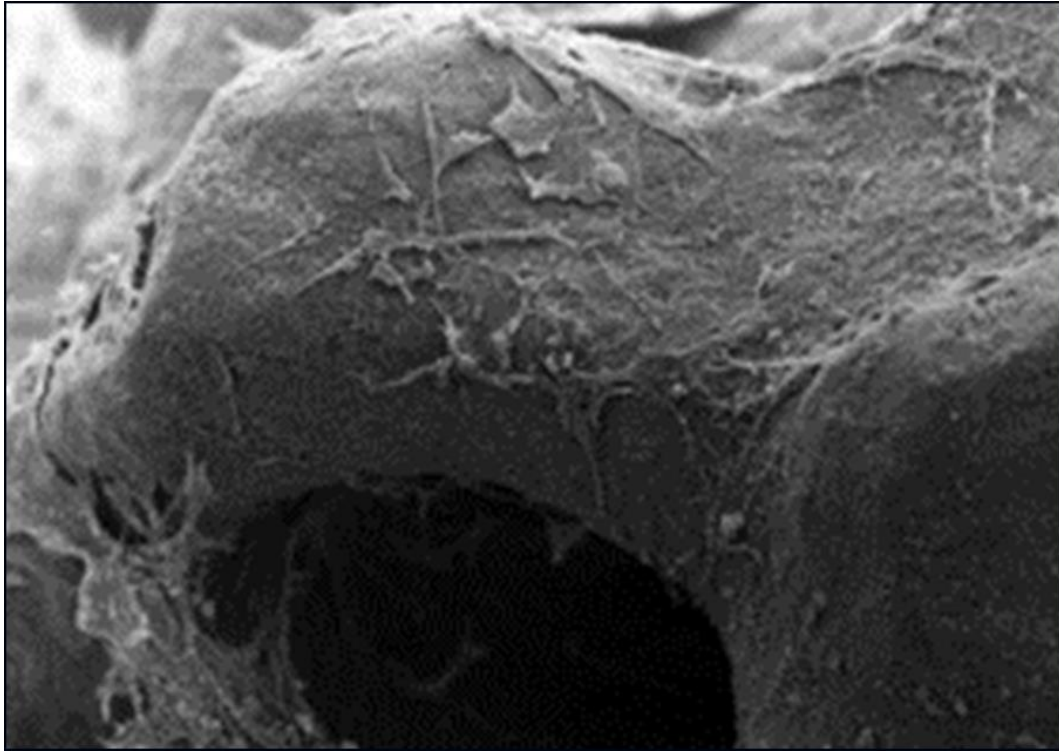


Figura 3. Célula madre mesenquimática.

Las células madre mesenquimales, también denominadas células madre estromales o MSCs (*mesenchymal stem cells*), se encuentran repartidas por el tejido conectivo de distintos órganos como médula ósea, sangre periférica, cordón umbilical, tejido adiposo, tejido sinovial, el músculo esquelético y algunos tejidos del feto. En el año 1970 se demostró *in vitro*, la presencia entre las células estromales de precursores que formaban colonias celulares con elevada heterogeneidad morfológica y capacidad proliferativa. Esta heterogeneidad, condujo a la hipótesis de la existencia de un tipo de célula pluripotente (capaz de diferenciarse a tejidos de origen mesodérmico, ectodérmico y endodérmico) y con capacidad de auto-

renovación, que se denominaron *bone marrow stromal stem cell* o *mesenchymal stem cells*.

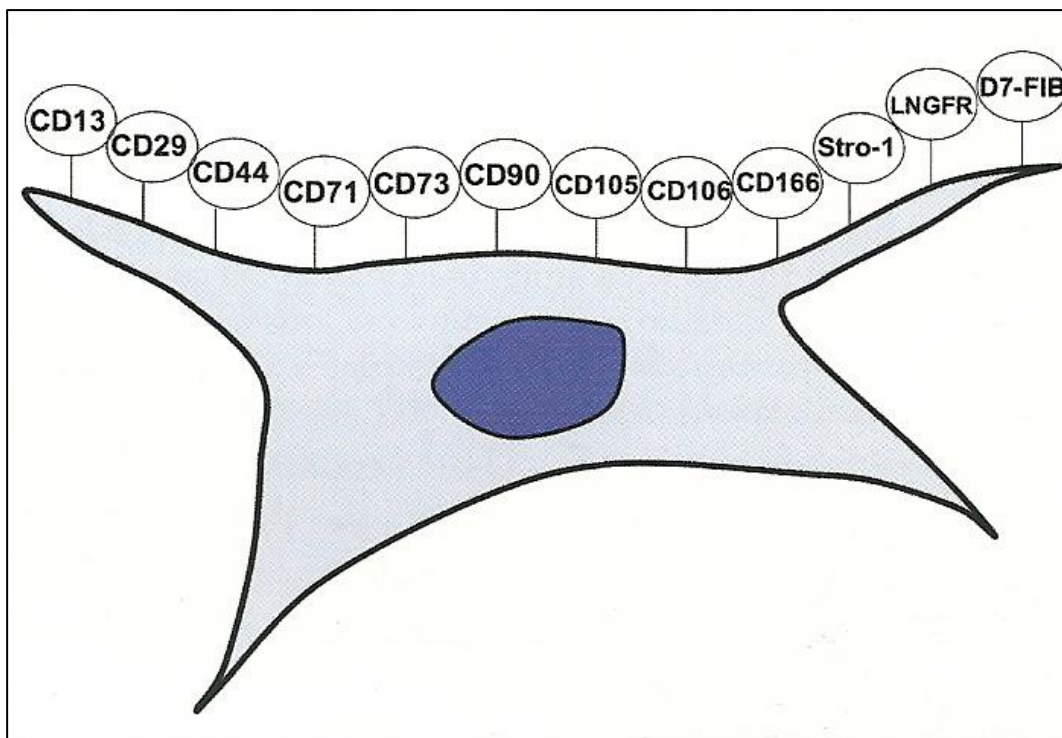
Estas células que pueden diferenciarse *in vitro* en una amplia variedad de células, incluyendo osteoblastos, condrocitos y adipocitos (Caplan AI., 1994) , pueden aislarse desde una pequeña muestra de tejido, proliferar en cultivo hasta obtener cantidades apropiadas para aplicaciones clínicas y ser implantadas en el mismo paciente (Caplan AI., 2007) . Por tanto, las MSCs constituyen una herramienta potencial para regenerar tejidos, ya que eluden problemas con el rechazo inmune del alotrasplante y evita el conflicto ético asociado al uso de células madre embrionarias. Si bien debemos tener presente, que el número de MSCs va variando, de modo inversamente proporcional a la edad, aunque llegan a estar presentes durante toda la vida del individuo; así, en el recién nacido podemos encontrar una MSCs por cada 10.000 células de médula ósea, mientras que a los 80 años de edad sólo se puede encontrar una por cada dos millones. Sin embargo, su capacidad de diferenciarse en cartílago y hueso es independiente de la edad del donante.

1.2.2 Caracterización fenotípica

Actualmente no hay marcadores específicos y exclusivos para una determinación precisa de las MSCs. Los principales criterios para su identificación son su adherencia al plástico del frasco de cultivo y su morfología fibroblástica (Prockop DJ., 1997), su capacidad de proliferación prolongada en cultivo manteniendo sus características de células madre, su capacidad para diferenciarse *in vitro* en células de origen mesodérmico (al menos en osteoblastos, condrocitos y adipocitos) y la expresión de

marcadores de membrana celular característica de las MSCs de MO (Rasini y cols., 2013).

Cada progenitor celular de una línea tisular concreta presenta un patrón de expresión de marcadores determinado (*cluster of differentiation, CD*) (Young, 2004). De esta forma, las MSCs expresan Stro-1 (Simmons y cols., 1991), CD29 (β 1-integrina), CD44 (H-CAM), CD73 (ecto-5 nucleotidasa, SH3, SH4), CD90 (Thy-1), CD105 (endoglina, SH2) y CD166 (ALCAM) (Pittenger y cols., 1999), pero no expresan marcadores característicos de células madre hematopoyéticas, como CD34 y CD45 (Gelse y cols., 2003). (Fig. 4).



*Figura 4. Antígenos de superficie que caracterizan a las MSCs.
Figura tomada de Forriol F, 2008.*

Tampoco expresan CD11b, un marcador celular inmunológico; glicoporina-A, un marcador de línea eritroide ó CD45, un marcador de células hematopoyéticas, ni el CD31, expresado en células endoteliales y hematopoyéticas y el CD117, un marcador de células troncales hematopoyéticas y progenitoras. Otros muchos marcadores no son tenidos en cuenta por su falta de consistencia en la expresión o especificidad o por falta de suficientes datos, como son los CD271/NGFR, CD105, CD90/Thy-1, CD44, CD29, CD13, Flk-1/CD309, Sca-1 y CD10.

Entre los marcadores de superficie positivos para su identificación, la molécula CD73 se presenta como un marcador de linaje para las MSCs. Se trata de una glicoproteína cuya función biológica consiste en hidrolizar nucleótidos extracelulares para permitir el ingreso de nucleósidos y así generar ATP y GTP como fuente de energía celular en células diferenciadas. Su papel en las MSCs se cree está más relacionado con mecanismos de adhesión celular, dado que se ha encontrado co-expresado con integrinas B2.

Las MSCs, aisladas de médula ósea, también expresan la molécula CD90, una proteína que forma parte de las inmunoglobulinas y cuyo ligando principal es el CD45. Algunos estudios han identificado que las células CD90+, cuando se someten a estrés mecánico, se diferencian hacia células similares a osteoblastos, disminuyendo la expresión de CD90, lo que podría mostrar que este antígeno es un marcador de precursores mesenquimales tempranos que pueden diferenciarse en osteoblastos.

La CD105, también conocidas como endoglina, es una glicoproteína que forma parte del receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGF-B), lo que sugiere que guarda un papel relevante en la diferenciación condrogénica de las MSCs y sus interacciones con las células

hematopoyéticas. También se conoce que el CD105 interviene en la regulación de distintos componentes de la MEC como fibronectina y colágeno, por lo cual se le relaciona con procesos de angiogénesis y reparación vascular.

En 2006, la sociedad internacional de investigación de células madre estableció un conjunto de criterios para la definición de MSCs, debería cumplir: (1) células de plástico adherente; (2) capaz de diferenciación a hueso, cartílago y grasa; (3) fenotípicamente positivo para CD105, CD73 y CD90; y (4) negativo para el CD45, el CD34, el CD11b, el CD14, el CD79a y HLA-DR. Sin embargo, estos criterios se basan en la caracterización de las células cultivadas *in vitro* y no se aplican al fenotipo nativo *in vivo*. Por ejemplo, el CD34 se considera un marcador de células madre hematopoyéticas y endoteliales progenitoras para aspirar las células recién cosechadas en médula ósea, pero no en las MSCs. Simmons en 1994, identifica el anticuerpo Stro-1 como marcador de MSC *in vivo*. En resumen, el fenotipo *in vivo* plausible de MSCs es CD146 + / Stro-1 + / CD90 + / CD105 + / CD73 + CD44 + / CD45- / 11b- / CD14- con poca o ninguna expresión de CD34. (Dominici y cols., 2006).

1.2.3 Fuente de células

Las MSCs presentan una amplia distribución *in vivo*, de modo que pueden aislarse de periostio (Nakahara y cols., 1990), pericondrio (Douchis y cols., 1998), tejido conectivo de la dermis y del músculo esquelético (Young y cols., 2001), grasa (Zuk y cols.), sangre del cordón umbilical y periférica (Mareschi y cols., 2001), membrana amniótica (Alviano y col., 2004) e incluso del propio cartílago articular (Alsalamah y cols., 2004). De

todas ellas, es la MO la fuente tisular de MSCs más utilizada (Yoo y cols., 1998).

Médula ósea

La MO ha sido considerada clásicamente una de las principales fuentes de MSCs. Consiste en un tejido complejo compuesto por células hematopoyéticas (precursores y células diferenciadas) y una mezcla heterógena de células denominada estroma. En el estroma se incluyen adipocitos, reticulocitos, células endoteliales y células fibroblásticas, que están en contacto con los elementos hematopoyéticos. Entre las células del estroma es donde se encuentra también la pequeña población celular de MSCs, con capacidad de diferenciación en múltiples tejidos mesenquimales (Park y cols., 2006).

Tejido adiposo

La presencia de MSCs en el tejido adiposo está también demostrada. Las células obtenidas de esta fuente tienen una morfología, fenotipo y capacidad de diferenciación *in vitro* similar a las obtenidas de MO, tienen una mayor capacidad de proliferación y es posible acceder más fácilmente a muestras de tejido adiposo a través de procedimientos como liposucción o abdominoplastia (Kerny cols., 2006)

Músculo esquelético

El músculo esquelético es uno de los pocos tejidos adultos humanos que poseen la capacidad de regeneración, formando un nuevo tejido funcional. Esta capacidad es debida a la presencia de células madre musculares conocidas como células satélite que se localizan bajo la lámina basal de las fibras musculares (Zvaiflery y cols., 2000). Además de su capacidad

miogénica, se ha descrito que estas células son capaces de diferenciarse en respuesta a estímulos específicos a líneas no musculares, incluidos osteoblastos y adipocitos (Zammit y cols., 2006). Las células satélite, que se mantienen en un estado quiescente, se activan cuando se produce una lesión, de modo que proliferan y se diferencian en nuevas fibras musculares.

1.2.4 Capacidad de proliferación y diferenciación

Una característica que define a la célula madre es su potencial de autorrenovación, es decir, de dividirse durante un número elevado de divisiones mitóticas generando copias idénticas a ella misma (Fig. 5). Este potencial de proliferación varía según la metodología empleada para el aislamiento y cultivo de MSCs.

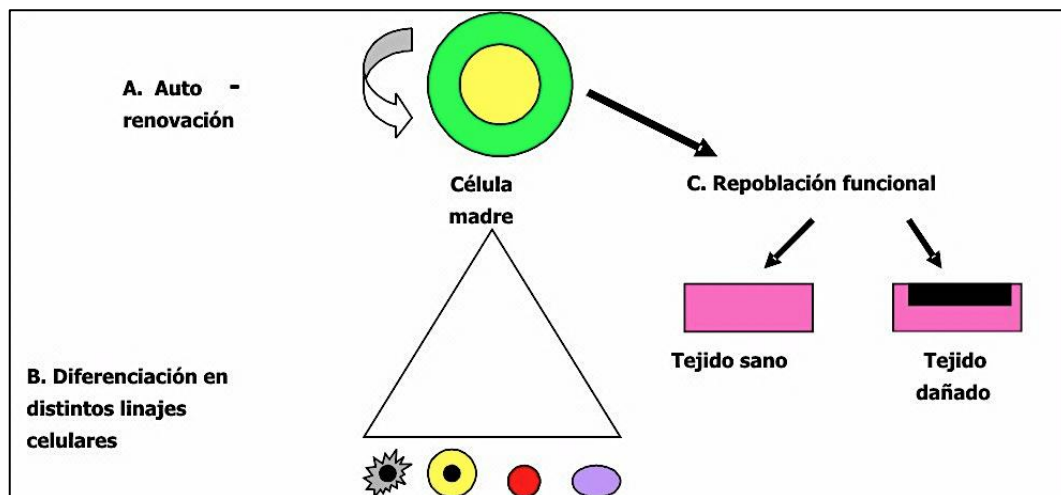


Figura. 5. Propiedades de las células madre.

La baja cantidad de MSCs aisladas desde una muestra de tejido hace necesaria su proliferación *in vitro* para obtener un número apropiado para su aplicación clínica. No obstante, el número de divisiones mitóticas deber

ser limitado, debido a que durante el cultivo *in vitro* las MSCs envejecen, experimentando una marcada disminución de su capacidad proliferativa (Bonab y cols., 2006) y una pérdida gradual del potencial de diferenciación múltiple (Izadpanah y cols., 2006). La longitud de los telómeros en las células o la edad del donante guardan relación con las características de las MSCs, dado que con el envejecimiento se produce una reducción de su capacidad proliferativa.

La adición de factores de crecimiento al medio de cultivo puede prolongar *in vitro* la multipotencialidad de las MSCs. Así, se ha observado que la presencia de FGF tipo 2 y 10% de suero fetal bovino (FBS) permite la proliferación de MSCs derivadas de MO más allá de 70 pases de cultivo y mantiene su potencial de diferenciación hasta 50 pases (Baksh y cols., 2004). La densidad celular también juega un papel importante en la capacidad de proliferación de las MSCs. Se ha observado que, a diferencia de lo que ocurre a altas densidades (12 células/cm²), cuando se siembran a bajas densidades (1,5-3 células/cm²) se producen altas expansiones (Colter y cols., 2000).

En el laboratorio, las MSCs pueden diferenciarse en múltiples líneas celulares, incluyendo osteoblastos (Jaiswal y cols., 1997), condrocitos (Johnstone y cols., 1999), adipocitos (Purpura y cols., 2004), mioblastos (Wakitani y cols., 1995) y progenitores tempranos de células neurales (Deng y cols., 2005) (Fig. 6). Esta capacidad múltiple de diferenciación convierte a estas células en candidatas ideales como fuente celular para la regeneración terapéutica de tejidos (Nishimura y cols., 1999). Estudios *in vitro* (Banfi y cols., 2000) e *in vivo* (Gronthos y cols., 2003) de MSCs derivadas mediante clonación demostraron que la población de MSCs es heterogénea respecto a su potencial de diferenciación, y comprende subpoblaciones con diferente expresión de marcadores y potencial de

diferenciación celular. Esto sugiere que una población celular particular de células puede ofrecer ventajas para la regeneración tisular.

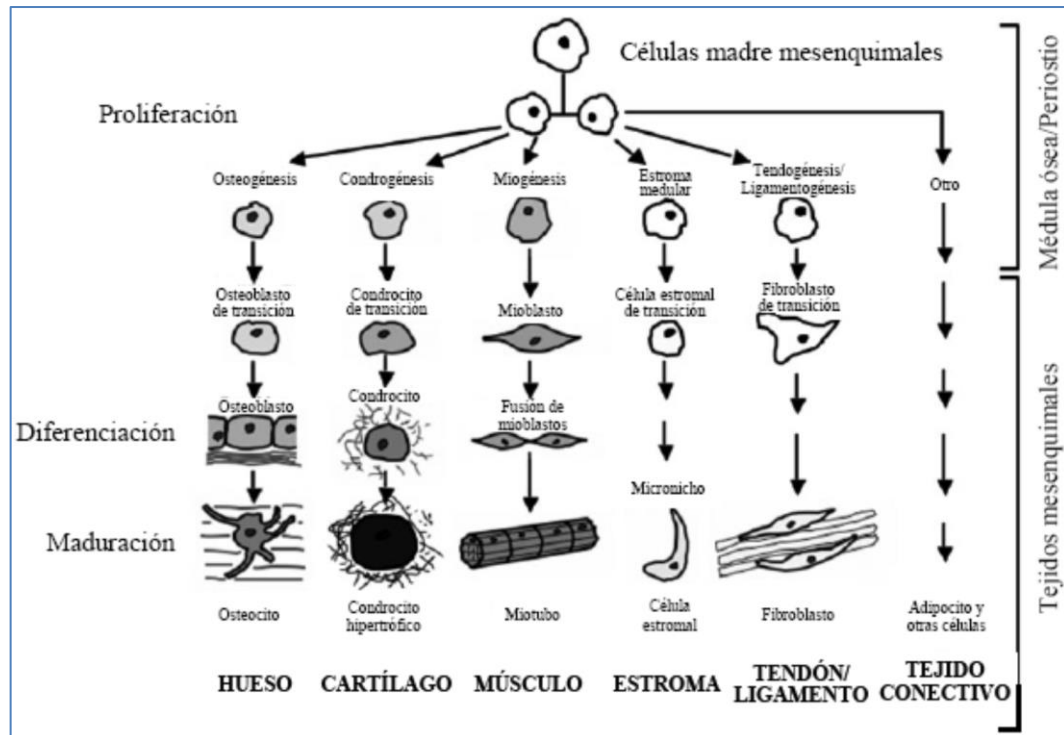


Figura 6. Diferenciación de las MSCs. Figura tomada y modificada de Caplan 2007.

Estudios recientes (Deng y cols., 2001) han demostrado que el CD271 es un marcador clave de MSCs en MO y otros tejidos. Así, la expresión de CD271, también conocido como LNGFR (*low affinity nerve growth factor receptor*), podría ayudar en el aislamiento de MSCs de diferentes tejidos. Se han realizado estudios que indican que la población de MSCs procedentes de MO y membrana fetal, resultantes de la selección de células que expresan CD271, son fenotípica y funcionalmente homogéneas y tienen una elevada capacidad de diferenciación hacia múltiples líneas celulares mesenquimales (Soncini y cols., 2007). La capacidad de

diferenciación de las MSCs también puede variar significativamente en función del tejido del que se aíslan (Fig. 6). De esta forma, en rata, se ha observado que las MSCs aisladas de pericondrio, periostio y MO parecen ser superiores a las MSCs aisladas de grasa en la capacidad de formar cartílago articular hialino (Park y cols., 2006).

1.3. Biomateriales

1.3.1 Generalidades

Los tres pilares básicos sobre los cuales se sustenta la Ingeniería Tisular para desarrollar reemplazos de tejidos son: 1) prevenir la respuesta inmunológica, ya sea inflamación, rechazo o ambas; 2) crear un sustrato ideal para la supervivencia, desarrollo y diferenciación celular; y 3) proveer un adecuado medio ambiente para el desarrollo celular y tisular, crucial para mantener la función celular y el desarrollo del tejido neoformado.

Un biomaterial es todo aquel compuesto, farmacológicamente inerte, diseñado para ser implantado o incorporado dentro del sistema vivo. Por tanto, corresponden a todos los materiales destinados a estar en contacto con los sistemas biológicos con el objetivo de tratar, aumentar o sustituir un tejido, órgano o función del organismo. El implante de un biomaterial genera reacción de los tejidos vivos receptores, produciéndose un proceso inflamatorio de cuantía variable que concluye con la cicatrización.

En la reacción de los tejidos también influyen los productos de corrosión, degradación o abrasión del material implantado.

El objetivo principal de los estudios de biocompatibilidad es analizar posibles respuestas adversas, tales como, inflamación, pirogenicidad,

toxicidad sistémica, sensibilización, mutagenicidad, carcinogenicidad y reacción a partículas extrañas. Además, estos ensayos permiten determinar el comportamiento y actuación de los nuevos materiales. El riesgo biológico de la utilización de los biomateriales depende de la sustancia utilizada, de su actividad específica, de la cantidad implantada y de la frecuencia y/o del tiempo de exposición. La información debe obtenerse en las condiciones más parecidas posibles a su posterior uso en la clínica humana, hecho en que cumplen un importante papel los diferentes modelos animales que permiten investigar la eficacia de los nuevos biomateriales (Burg y cols., 2000).

1.3.2 Biomateriales como sustitutivos óseos

Los biomateriales que tienen utilidad como sustitutivos óseos son los que al ser implantados tienen la capacidad de promover la regeneración o reparación ósea, por lo que pueden ser empleados, con éxito, en el tratamiento de fracturas conminutas con pérdida de tejido óseo, en la solución de cavidades generadas por la resección de tumores óseos o para rellenar defectos óseos secundarios a endoprótesis, pseudoartrosis y artrodesis fracasadas. Se considera que los biomateriales ideales son aquellos que progresivamente son sustituidos por tejido óseo neoformado del hueso receptor.

Un biomaterial óptimo para la sustitución ósea debe ser osteoconductor, para lo cual necesita proporcionar un armazón apto para guiar los fenómenos óseos reparativos; estructuralmente resistente, para aportar de acuerdo con su formulación específica el mejor soporte biomecánico hasta su reemplazo por el tejido óseo neoformado; y biorreabsorbible, es decir, capaz de ser degradado progresivamente sin generar productos tóxicos (Bauer y cols., 2002).

Los materiales que pueden ser empleados como sustitutivos óseos corresponden a biomateriales cerámicos, poliméricos y compuestos, destacando entre estos las cerámicas de fosfatos de calcio porque son comparativamente similares a la fase mineral del hueso.

1.3.3 Cerámicas porosas inertes

Podemos clasificar los biomateriales cerámicos como cerámicas cristalinas inertes, cerámicas porosas inertes, cerámicas cristalinas bioactivas y cerámicas porosas bioactivas (Greenspan y cols., 1999).

Las cerámicas porosas inertes proporcionan una buena estabilidad mecánica, debido a su fijación biológica, lo que permite la colonización ósea al interior de sus poros. Sin embargo, la porosidad de estos biomateriales limita su utilización en áreas de carga, dado que para facilitar el crecimiento óseo y la vascularización los poros deben tener un diámetro superior a 100 μm . De este modo, el implante permite la osteoconducción actuando como puente estructural y modelo para la formación de tejido óseo. Los mejores representantes de este grupo son las cerámicas de carbonato de calcio, derivadas del coral.

El coral corresponde al esqueleto calizo de varias especies de invertebrados marinos, que se encuentra compuesto por carbonato cálcico y se caracteriza por poseer una estructura porosa de dimensiones variables de acuerdo con la especie de origen. La microestructura del coral es un excelente material para molde de inversión de estructuras con tamaño de poros controlados, a través del proceso de duplicación, debido a la gran uniformidad de sus medidas e interconexión. Las mejores cepas de coral corresponden a la familia de las Poritas, que tienen poros interconectados de 140 a 160 μm ; así como las Gonioporas que poseen poros de 200 a 1.000 μm ; éstas últimas tienen una arquitectura macroscópica similar al hueso esponjoso

humano. Considerando sus diferencias bioquímicas, se pueden distinguir dos grupos principales que corresponden a los corales madreporicos y la hidroxiapatita coralina.

Los corales madreporicos se caracterizan por conformar grandes colonias en su hábitat marino. El biocoral corresponde a un biomaterial químicamente inalterado que se obtiene a partir del esqueleto mineral coralino del género Scleractinian y que se encuentra compuesto por carbonato cálcico. Se trata de un material osteoconductor que se reabsorbe lentamente y se utiliza en clínica desde 1979 (Shors y cols., 1999).

La hidroxiapatita coralina corresponde a un biomaterial poroso que se obtiene a partir de corales marinos, en los que por un proceso de intercambio hidrotermal, el carbonato cálcico de sus esqueletos es transformado en fosfato de calcio. Se trata de un material osteoconductor que es escasamente reabsorbible, aunque las adaptaciones realizadas actualmente en el proceso de fabricación industrial sí le confieren esa cualidad.

Existen dos hidroxiapatitas coralinas disponibles para su utilización clínica, una que posee un tamaño de poros entre 190 y 230 μm ofreciendo un diseño adecuado para matrices de reconstrucción del hueso cortical y que se obtiene a partir de la replicación de especies coralinas del género Porites porites, y otra que presenta un tamaño de poros de 500 μm (Hollister y cols., 2005). (Fig. 7)

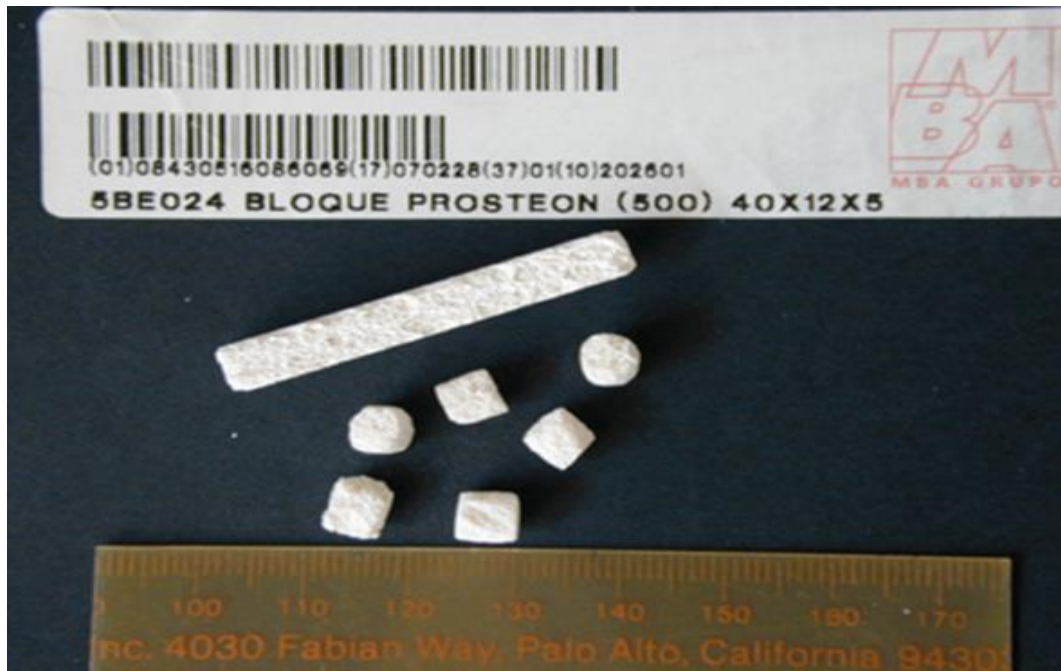


Figura 7. Bloques de hidroxiapatita de 5x5 mm.

1.4 Ingeniería tisular

1.4.1 Generalidades

La Ingeniería Tisular puede definirse como la creación o inducción de la formación de un tejido específico, en una localización específica, por medio de la manipulación y selección de células, matrices y estímulos biológicos. Es un campo interdisciplinar que aplica principios de ingeniería y ciencias de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función tisular.

La Ingeniería Tisular combina el aporte de células, indiferenciada o no, que se colocan sobre una matriz a la cual se pueden añadir factores de crecimiento que aceleren su proliferación y diferenciación para ser trasplantadas a una estructura dañada y conseguir su regeneración (Forriol, 2008).

1.4.2 Cultivo y terapia celulares

En los años 40, la incorporación de penicilina y estreptomicina a los medios de cultivo celulares permitieron disminuir notablemente la contaminación de los mismos. En 1955, Eagle estudió las necesidades mínimas nutricionales de las células, produciéndose el primer medio básico químicamente bien definido (Eagle H., 1955). Seguidamente, en 1965 se introdujo el primer medio de cultivo libre de suero capaz de mantener el crecimiento de algunos tipos celulares, quedando así establecidas las bases del moderno cultivo celular (Ham RG., 1965).

El desarrollo de un sistema de cultivo de células de médula ósea en un gel de colágeno permite aislar, amplificar e inducir hacia el linaje condro-osteogénico una población de células que expresan marcadores de tales tejidos in vitro y forman cartílago y hueso ectópicos, cuando se las implanta in vivo (Claros y cols., 2012). Este procedimiento permite usar los factores con dominios de unión al colágeno de forma selectiva y controlada, influenciando el proceso de manera específica (Andrades y cols., 2001c,).

Como fuente celular para la formación de tejido osteocartilaginoso se utilizan células mesenquimales, indiferenciadas o pluripotentes. En el caso de las células mesenquimales, existen una serie de condiciones conocidas que inducen su diferenciación hacia el fenotipo osteocondroide, entre los que se encuentran la utilización de un medio de cultivo sin suero, o la adición de dexametasona, ascorbato, factores de crecimiento transformantes-beta (transforming growth factors-beta TGF β s) o proteínas morfogenéticas de hueso (bone morphogenetic proteins, BMPs), siendo el método de cultivo tridimensional a alta densidad uno de los más empleados para aquel fin. En este sentido, se podría hacer un injerto

osteocondral cultivando células mesenquimales a alta densidad, añadiendo TGF β y consiguiendo así una colonia de células que luego se utilizaría para recubrir o rellenar el armazón de un polímero biodegradable.

En la literatura se describen múltiples líneas de investigación de cultivos celulares para la obtención de tejido osteocartilaginoso, donde se utilizan distintas matrices, y distintos factores de crecimiento. Así, en el grupo del Laboratorio de Bioingeniería y Regeneración de Tejidos (LABRET), de la Universidad de Málaga (UMA) se ha desarrollado específicamente uno con buenos resultados in vitro e in vivo, donde la fuente celular son las MSCs; como factores se usan un TFG- β recombinante humano con un dominio de unión específica al colágeno (rhTGF- β 1-F2) y/o rhBMP-2, y como promotores de la expresión de marcadores óseos se utilizan el β -glicerol fosfato y la dexametasona (Andrades y cols., 2002 y 2003).

1.4.3 Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento (growth factors, GFs) son un conjunto de sustancias, la mayoría de naturaleza proteica que, junto con las hormonas y los neurotransmisores, desempeñan en el organismo una importante función en la comunicación intercelular. La función de los GFs no es sólo la de estimular la proliferación celular, mediante la regulación del ciclo celular iniciando la mitosis, sino también el mantener la supervivencia celular, estimular la migración y diferenciación celular, e incluso la apoptosis.

Son producidos por gran número de células y los requerimientos son muy variables entre diferentes células. Para que las células proliferen en un cultivo es necesaria la existencia de suero que aporte GFs. Existen varios

tipos de GFs, algunos de ellos, por su capacidad osteo- y condrogénica, han sido usados en Ingeniería Tisular.

1.4.3.1 Factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β)

El TGF- β pertenece a una familia de proteínas relacionadas llamada la superfamilia de los TGF- β s. Esta familia de proteínas incluye las cinco isoformas de TGF- β (TGF- β 1 a TGF- β 5). Los TGF- β s influyen en un amplio espectro de actividades celulares, incluyendo el crecimiento, la diferenciación, y la síntesis de matriz de extracelular.

El TGF- β se encuentra en muchos tejidos, pero es particularmente abundante en hueso, plaquetas y cartílago. En el hueso, se piensa que es liberado por plaquetas después de la formación del coágulo en el momento de la fractura. Los condrocitos y osteoblastos tienen abundantes receptores para los TGF- β s, reforzando la hipótesis que esta familia de factores de crecimiento actúa en el proceso de reparación ósea en todas sus etapas (Janssens y cols., 2005).

El papel del TGF- β en la reparación ósea ha sido estudiado en múltiples modelos experimentales, tales como inyecciones subperiostales en fémur, en calvaria y en defectos segmentarios diafisarios, entre otros. Pero es difícil mostrar conclusiones sobre la eficacia de los TGF- β s en dichos estudios experimentales, ya sea por el uso de diferentes isoformas, distintas dosis y distintos modelos usados. Aunque sí confirman el hecho de que son factores que aumentan la proliferación celular y poseen potencial osteoinductivo, aunque limitado (Ahdjoudj y cols., 2002).

1.4.3.2 Proteína morfogenética de hueso BMP

La actividad de estas proteínas se observó por primera vez a mediados de la década de 1960, cuando se descubrió que podían inducir hueso ectópico (Urist, 1965). No fue hasta finales de 1980 cuando se caracterizó y clonó la primera BMP (Wang y cols., 1988). Muchos estudios han puesto de manifiesto la capacidad de las BMPs para inducir a las MSCs hacia la diferenciación osteogénica, lo que confirma su papel en la formación de hueso y cartílago. Desde su descubrimiento inicial, se ha demostrado que desarrollan acción sobre una amplia variedad de tipos de células y procesos, más allá de la propia osteogénesis. Son importantes morfógenos en la embriogénesis y el desarrollo, y también regulan el mantenimiento de la homeostasis del tejido adulto.

Hasta la fecha se han aislado y clonado más de 40 BMPs de diferentes tejidos. Las BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 y BMP 9 tienen propiedades osteoinductivas. Sin embargo, la BMP-3 y la BMP-13 son inhibidoras de la formación ósea (Shu y cols., 2011).

Son proteínas pleiotrópicas con múltiples y diferentes acciones biológicas, ya que regulan la hematopoyesis, estimulan la síntesis de matriz extracelular e influyen en el mantenimiento celular, además de participar también en la apoptosis celular.

Las BMPs son proteínas formadas por dos cadenas polipeptídicas idénticas. Tras la disociación de las correspondientes secuencias de propéptidos se produce la proteína biológicamente activa. Con excepción de la BMP-1, que es idéntica a la proteinasa de procolágenos C, todas las BMPs presentan restos de cisteína en su extremo C7 terminal y, por ello, se engloban en la superfamilia del TGF- β . Entre los miembros de esta amplia familia, emparentados con las BMPs, se encuentran, entre otros, la activina

y la inhibina. En la familia BMP también se incluyen los llamados factores de crecimiento/diferenciación (growth differentiation factor, GDF). La BMP-12 y BMP-13 representan el homólogo humano del GDF-7 y GDF-6 de rata, respectivamente. Éstos están emparentados con el GDF-5 (BMP-14), que colabora en el desarrollo de cartílago y hueso en las extremidades de la rata. En virtud de sus propiedades de formación de cartílago, el GDF-5 y GDF-6 también han sido relacionadas con las propiedades derivadas de cartílago 1 y 2 (cartilage derived morphogenetic protein, CDMP-1 y CDMP-2). En los últimos años, también se han identificado los genloci para BMP-2 a BMP-7 humanas, habiéndose localizado en el cromosoma 20, el genlocus para BMP-3 en el cromosoma 4, el genlocus para el BMP-4 en el cromosoma 14, así como los genloci para el BMP-5 y BMP-6 en el cromosoma 6. Recientemente, además, se ha logrado el análisis de estructuras radiográficas de BMP-2 y BMP-7 cristalizadas. La estructura tridimensional de ambas proteínas muestra una gran similitud con el TGF- β 2 y el TGF- β 3, respectivamente (Luu y cols., 2007).

Las BMPs tienen una función en el crecimiento y diferenciación de condroblastos y osteoblastos *in vitro*, y una variada actividad biológica regulando el crecimiento, diferenciación, quimiotaxis y apoptosis, además de funciones en la morfogénesis de diferentes tejidos y órganos, como el renal y el nervioso (Reddi y cols., 1992).

Así pues las BMP participan en la multiplicación, diferenciación, muerte programada (apoptosis) y morfogénesis. Las BMP suelen tener 30-38kDa que son sintetizados como prepro péptidos, consistentes en 400-525 aminoácidos, variando en los sitios de glicosilación ligada al nitrógeno.

1.5 Principios básicos de la osteosíntesis

En cualquier osteosíntesis, sea de hueso largo (diafisaria, epifisaria, metafisaria), corto o del raquis, se aplican al menos uno de los cuatro principios fundamentales de ese tratamiento quirúrgico:

1. Compresión. La compresión consiste en someter la fractura a fuerzas confluentes de vectores contrarios. Cuando hay un espacio considerable entre el fragmento superior e inferior –o entre un cuerpo vertebral superior e inferior (espacio intersomático) – se debe colocar un injerto tricortical que estará sometido a compresión (entre los 2 cuerpos vertebrales), pero que provocará sostén a estos cuerpos vertebrales entre sí, evitando que se aproximen. Produce gran estabilidad, pero desaparece pasadas aproximadamente 3-4 semanas. Por ello hay que añadirle, al menos, neutralización.

En huesos largos con fracturas diafisarias transversas, es el ejemplo clásico del principio de la compresión.

2. Neutralización. La neutralización previene las fuerzas rotatorias y tangenciales (cizallantes) que desplazan los fragmentos entre sí. Debe aplicarse tras los otros principios. No es posible aplicar compresión tras neutralización porque los fragmentos no progresan entre sí hasta unirse. La neutralización debe aplicarse siempre después de la compresión.

3. Sostén. El principio de sostén mantiene la altura de los fragmentos. Es aplicable en casos de fractura por conminuta en la osteosíntesis diafisaria o en casos de fractura por compresión del cuerpo vertebral tras mantener la altura mediante tracción posterior con un sistema de instrumentación.

4. Tirante. El principio del tirante combina la compresión anterior sobre hueso (o injerto) con prevención de distracción posterior gracias al implante. El ejemplo más característico es el obenque de olecranon. (Guerado y cols., 2012) (Figura 8).

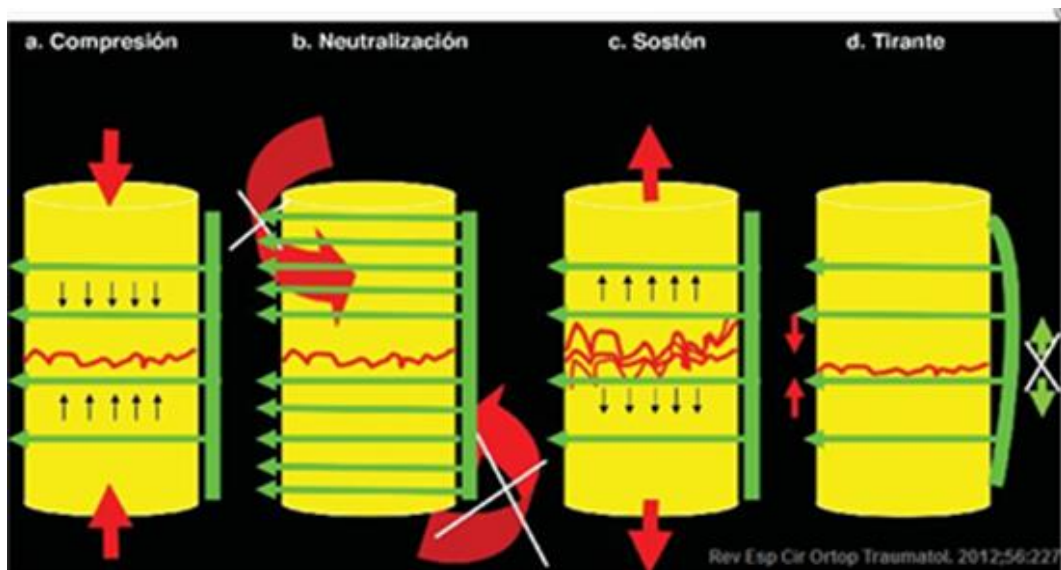


Figura 8. Los cuatro principios de la osteosíntesis. Tomado de Guerado 2012.

Hay diferentes medios de fijación de la fractura, en función del tipo de la fractura:

Placas: Existen diferentes modelos, fabricadas de acero inoxidable o de titanio, tienen varios agujeros y se colocan sobre la superficie de los huesos, aseguradas con tornillos. No necesariamente todos los agujeros son usados. Se clasifican sobre la base de algunos de sus atributos, ya sea forma, diseño de los agujeros, sitio elegido para la fijación o modo de aplicación.

Se utilizan con mayor frecuencia en fracturas de huesos largos, pero también en artrodesis de columna y muñeca. Requieren una incisión quirúrgica más amplia que otros tipos de fijación. Existe la posibilidad de alteración del flujo sanguíneo cortical, debido a la gran superficie de contacto, y de la consolidación, pudiendo reproducirse la fractura al retirar la placa, por atrofia ósea. En general, basan su funcionamiento en tres principios biomecánicos: compresión dinámica, neutralización y sostén.

Las placas de compresión comprimen los extremos de la fractura, se usan para fijar fracturas estables manteniendo la reducción y compresión. La compresión también se puede alcanzar a través de agujeros de diseño especial o por medio de la colocación excéntrica de los tornillos. Se pueden utilizar conjuntamente con tornillos fragmentarios.

La placa de compresión dinámica de bajo contacto o impacto (LCP) es un tipo de placa de compresión de desarrollo reciente, que se diferencia de la DCP por la forma del corte en su superficie inferior, que disminuye la superficie de aposición alrededor de los agujeros de los tornillos y entre éstos, minimizando la compresión placa-periostio, permitiendo mayor flujo capilar, y ayudando al proceso de cicatrización. Tiene cierto grado de deformación suave y elástica, sin concentrar el estrés alrededor de los agujeros. Las placas de compresión dinámica (DCP), diseñadas para la compresión axial, son uno de los tipos más utilizados; se reconocen por sus agujeros ovalados para la inserción excéntrica de los tornillos, cuyas paredes son biseladas hacia el piso e inclinadas hacia medial. La zona más débil de estas placas está alrededor de los agujeros ya que es la única zona que se puede doblar (Nassiri y cols., 2013).

Las placas de reconstrucción maleables son de amplia utilización en fracturas de pelvis, calcáneo y codo. Son arrosariadas por los sacabocados

entre los agujeros ovalados, lo que las hace maleables con facilidad en los tres planos, adaptándose a la forma y longitud requeridas en las superficies óseas complejas.

Las placas de neutralización se colocan sobre un foco de fractura conminuta. Diseñadas para proteger la superficie de la fractura, transmiten las fuerzas de incurvación, torsión y carga axial. Con frecuencia se combinan con tornillos fragmentarios.

Las placas de contención o sostén se usan en fracturas inestables como soporte del hueso delgado cortical periarticular, frente a las fuerzas de compresión o de carga axial, impidiendo su colapso. Se utilizan en radio distal y platillos tibiales.

Placas de diseño especial. La placa DCS se utiliza en fracturas supracondíleas. Tiene uno de sus extremos con ángulos cercanos a los 90° para adaptarse a las variaciones individuales y con forma de cincel para ser introducido dentro de la metáfisis. La placa se fija a la cortical con tornillos.

Las placas de diseño anatómico especial son una amplia gama, diseñadas para fines específicos: la placa condilar 95° para estabilización de fracturas del fémur proximal y distal; la placa condilar de sostén o contención para fémur distal; placa T 4.5 para húmero y tibia proximales; placa T oblicua angulada 3.5 para radio distal (Petsatodis y cols., 2010)

1.6 Justificación del trabajo

Durante los últimos años, los investigadores clínicos de nuestro grupo han tratado más de 30.000 casos de fracturas, de las cuales más de 5.000 lo

fueron mediante un procedimiento quirúrgico. Paralelamente, se llevaron a cabo más de 2.000 artroplastias y casi 600 intervenciones sobre la columna vertebral, las cuales requirieron implantes y adición de hueso con el objetivo de promover la osteogénesis terapéutica (Moro Robledo y cols., 1998; Guerado y cols., 2001; Guerado y cols., 2002; Guerado y cols., 2002a, 2002b); Guerado y cols., 2003). Siendo conscientes en nuestra Unidad de tales problemas clínicos, y ante la posibilidad de investigar posibles nuevas alternativas terapéuticas, en 1998 se inició una colaboración entre investigadores clínicos y básicos para tratar de buscar soluciones que solventaran los problemas de consolidación de las fracturas, de la osteointegración de implantes para artroplastias, y de la fusión espinal terapéutica.

Los investigadores básicos de nuestro grupo han demostrado que, a partir de MO de rata, se puede seleccionar en cultivo, mediante la adición adecuada de rhTGF- β 1-F2 y rhBMP-2, una población celular que expresa marcadores de diferenciación osteogénica y que presentan capacidad de formar hueso ectópico in vivo (Gordon y cols., 1997; Andrades y cols., 1999; Andrades y cols., 2003; Becerra y cols., 2006).

En la literatura no existen publicados estudios donde se empleara la capacitación celular aquí determinada, ni su asociación con un biomaterial como la HA, como elemento terapéutico en la reparación de fracturas en huesos largos.

Siguiendo el mismo procedimiento experimental, pretendemos ahora llevar las células capacitadas in vitro para reponer pérdidas importantes de hueso, en concreto en resecciones segmentarias de fémur. Con este trabajo pretendemos aplicar una técnica de ingeniería tisular, con MSCs cultivadas y osteoinducidas, en un modelo biomecánico de fractura ósea con defecto óseo de 5 mm, en un fémur de rata, estabilizado la fractura según el principio de neutralización, con una placa de osteosíntesis, y rellenando el defecto con aloinjerto, bloque de hidroxipatita, o HA con MSCs osteoinducidas en cultivo convencional y en cultivo tridimensional con gel de colágeno.

Capítulo II

2. HIPÓTESIS y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Hipótesis general

La efectividad de la terapia celular autóloga (o heteróloga entre animales singénicos), con ayuda de materiales osteoconductores, es mayor que del aloinjerto óseo en la osteogénesis terapéutica.

Hipótesis operativa (Ha)

La utilización de la terapia celular en las resecciones segmentarias de hueso mejora la efectividad del procedimiento tradicional con aloinjerto de banco o material osteoconductor solo (en este caso hidroxapatita). Ha: p_1 menor que P_2 para $p < 0.05$ (power 0.8) 1 cola.

Hipótesis nula (H0)

La utilización de terapia celular en las resecciones segmentarias de hueso no mejora la efectividad del procedimiento tradicional con aloinjerto de banco o material osteoconductor sólo (significa que puede obtener resultados iguales o peores). H0: p_1 igual o mayor a p_2 para $p < 0.05$ (power 0.8) 2 colas.

En la presente tesis se propone el modelo animal murino, con resección segmentaria de fémur, y tratamiento mediante bloque de HA como sustitutivo óseo, al que se incorporan MSCs procedentes de MO heteróloga, multiplicadas y diferenciadas en cultivo hacia el linaje osteogénico.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

Bajo las hipótesis anteriores, nuestro objetivo general es evaluar, mediante un estudio prospectivo, la eficacia de las células madre mesenquimales, procedentes de médula ósea, capacitadas in vitro, y adsorbidas a piezas de hidroxiapatita, tras su implantación en resecciones segmentarias de fémur.

A partir de los resultados que se obtengan, pretendemos realizar inferencias sobre su aplicabilidad a las poblaciones humanas aquejadas de patologías necesitadas de potenciación biológica de osteogénesis.

2.2.2 Objetivos específicos

Para abordar el objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Seleccionar y cultivar células madre mesenquimales de médula ósea de rata, utilizando dos procedimientos de cultivo.
2. Estudiar la diferenciación *in vitro* e *in vivo* de las células madre mesenquimales hacia el linaje osteogénico.
3. Abordar quirúrgicamente el implante de piezas de hidroxiapatita, como transportador de las células madre mesenquimales cultivadas, en un modelo *in vivo* de resección segmentaria.
4. Verificar un modelo experimental de promoción de la osteogénesis terapéutica en animales sobre esas variables (resección segmentaria en fémur de rata) con aplicación de células capacitadas *in vitro*.

Capítulo III

3. MATERIAL y MÉTODOS

Para abordar los objetivos planteados, hemos desarrollado un modelo experimental sobre resección segmentaria de fémur en rata, con las siguientes etapas:

1. Extracción de MO de ratas singénicas y cultivo celular.
2. Aislamiento y expansión de MSCs mediante cultivo adherente, o capacitación osteogénica en cultivos tridimensionales con gel de colágeno, en presencia de rhTGF- β 1 y rhBMP-2 (TRAP sinérgico).

* Nota: el término TRAP es de adjudicación libre, y publicado por parte de nuestro Grupo, haciendo referencia al método de capacitación ósteogénica llevado a cabo con las células atrapadas en el gel de colágeno.

3. Caracterización de las MSCs mediante citometría de flujo y estudios de diferenciación celular *in vitro* e *in vivo*.
4. Implantación en lesión segmentaria femoral usando un biomaterial de HA como transportador celular. Se incorpora un sistema de osteosíntesis que garantice la rigidez del segmento.
5. Análisis radiográfico e histológico de los tejidos de regeneración obtenidos, así como su integración en el hueso circundante.

3.1 Obtención y procesamiento de la médula ósea (MO)

Esta metodología está fundamentada en el procedimiento de selección de células osteoprogenitoras publicado por Andrades y col. (1999). Como fuente de MSCs se utilizó la MO, que fue obtenida de ratas singénicas hembras de 8 semanas de edad (Charles River), sacrificadas para la extracción de los fémures y posterior obtención de la MO. Una vez en el laboratorio de cultivos celulares del LABRET, las muestras en condiciones de esterilidad y frío se pasaron a nuevo medio de cultivo alpha-MEM con antibióticos (100 µg/ml penicilina G [Sigma], 50 µg/ml gentamicina [Sigma] y 0.3 µg/ml fungizona [Flow-ICN]). A continuación, la MO se disgrega por medio de repetidos pipeteos y se centrifuga a 1800 rpm durante 5 min.

3.2 Aislamiento y cultivo de las células

El centrifugado anterior se resuspende como sigue: por un lado, para iniciar el cultivo convencional en plástico (cultivo adherente), en medio de cultivo completo (10% de suero fetal bovino, FBS, GIBCO), y se siembra en frascos de cultivo FT-75 (Falcon TM), a los que renovamos el medio al cuarto día, y de ahí en adelante, cada 3 días, hasta obtener una semiconfluencia del 75% (en torno a 12 días). Por otro lado, para establecer el cultivo 3D, el centrifugado obtenido en el paso anterior se resuspende en medio de cultivo a muy baja

concentración de suero (0.5% FBS) y las células se mezclan con una solución de colágeno tipo I (0.35 mg/ml GIBCO), donde previamente se ha añadido el rhTGF- β 1-F2, a una concentración 1 ng/ml. Los cultivos se realizarán en placas de 48 pocillos (Falcon TM) a una concentración de 2×10^6 células/pocillo/150 ml de colágeno. Las placas de cultivo se llevan al incubador (37° C) durante 30 min para permitir la formación de geles de colágeno. Finalmente, sobre los geles se añaden 200 μ l de medio de cultivo bajo en suero por pocillo, conteniendo el factor de crecimiento (éste se omite en la situación control). El medio de cultivo se renueva cada 3-4 días añadiendo factor de crecimiento fresco. Todos los cultivos se mantienen en una atmósfera con 95% de aire y 5% CO₂, a 37° C de temperatura y 100% de humedad relativa.

En el caso de los cultivos en 3D, durante los 10 primeros días las células se cultivan a muy baja concentración de suero (0.5% FBS) y se denomina período de selección (PS); se realiza con el propósito de eliminar la mayor parte de las células de la línea hematopoyética. La presencia del rhTGF- β 1-F2, permitirá mantener vivas de manera selectiva la población de células madre osteoprogenitoras que pretendemos seleccionar.

En el día 11 de cultivo iniciamos el período de amplificación e inducción (PA-I), que consiste en cambiar a medio de cultivo completo (10% FBS) durante siete días. En los tres últimos días de este período, añadiremos el rhBMP-2 (50 ng/ml, R&D Systems), en vez del rhTGF- β 1-F2, para aprovechar la capacidad

de inducción osteogénica de aquel factor. Asimismo, añadiremos dexametasona (dex) 10^{-8} M (Sigma) y beta-glicerolfosfato (β -GP) 2 mM (Sigma), que han mostrado amplia eficacia en la estimulación de células en cultivo de distintos orígenes, para promover la expresión de marcadores óseos. La dex estimula la expresión de FA, necesaria para la mineralización, y el β -GP eleva los niveles de fósforo inorgánico, necesario para la formación de fosfato cálcico.

3.3 Caracterización de las células

3.3.1 Citometría de flujo

Se trata de una técnica sencilla que, gracias a su gran especificidad, nos permite distinguir entre varias poblaciones celulares diferentes, y detectar una población celular en una muestra en la que predominan otras poblaciones celulares mayoritarias, siendo su principal característica ofrecernos información simultánea de varios parámetros de cada una de las células analizadas.

Como no se dispone actualmente de un marcador específico único de células madre, la caracterización fenotípica por citometría de flujo (FACS, fluorescent activated cell sorted) se realizó aprovechando el amplio panel de anticuerpos anti-CDs disponibles en el LABRET. Es una técnica de análisis celular cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (células), alineadas y de una en una, por delante de un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes

parámetros de las células y que son recogidos por distintos detectores, que convierten las señales en emisiones electrónicas que son a continuación digitalizadas. Estas señales producidas por la interacción de las células con el haz de luz son de dos tipos: señales de dispersión y de fluorescencia.

En los últimos años se han descrito distintos marcadores de superficie que han permitido identificar y aislar MSCs, como CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, HLA-I y STRO-1. Y de igual forma, existen antígenos de superficie característicos de las células madre hematopoyéticas (HSCs) que las acompañan en la MO, como CD14, CD34 ó CD45. Las características de los anticuerpos monoclonales empleados en el estudio fenotípico se muestran en la siguiente relación (tabla 1). En cada tubo, las células fueron incubadas con tres anticuerpos para facilitar la identificación (Apéndice).

	Casa Comercial	Clon	Isotipo	Fluorocromo
CD29	R&D, Reino Unido	P5D2	IgG1	PE
CD34	<u>Miltenyi Biotec</u>	AC133	IgG2a	FITC
CD44	BD <u>Pharmingen</u>	G44-26	IgG2b, lambda	APC
CD45	<u>Miltenyi Biotec</u>	5B1	IgG2a	APC
CD73	BD <u>Pharmingen</u>	AD2	IgG1, lambda	PE
CD105	R&D, Reino Unido	166707	IgG1	FITC
CD166	<u>AbD serotec</u> , R	3A6	IgG1	FITC
CD271	BD <u>Pharmingen</u>	G46-2A	IgG1,k	FITC
Stro-1	R&D, Reino Unido	Stro-1	<u>IgM,lambda</u>	-----

Tabla 1: anticuerpos monoclonales empleados en el estudio fenotípico.

3.3.2 Capacidad condro/osteogénica de las células

Con el fin de comprobar la capacidad osteogénica de las células obtenidas, se procedió a analizar *in vivo* la formación de cartílago/hueso en implantes ectópicos, realizados en la espalda de ratas singénicas.

Las células fueron implantadas en cámaras de matriz ósea desmineralizada (demineralized bone matrix, DBM) y cámaras de difusión (diffusion chamber, Dch). Las cámaras de DBM presentan mejores propiedades osteoinductoras por la presencia de BMPs en su matriz orgánica. Son cilindros de hueso cortical, procedentes de las diáfisis de fémures de rata, a los que se les ha eliminado su matriz inorgánica por la exposición prolongada al ácido clorhídrico (Apéndice).

Las cámaras de Dch son sintéticas, y consisten en un anillo plástico al que se le pegan por ambas caras sendos filtros de nitrocelulosa porosos (tamaño de poro de 0.2 micras, Millipore). A través de un orificio presente en el anillo se inyectan las células mediante una jeringa de insulina.

Para el estudio *in vivo* se implantaron las siguientes condiciones experimentales:

- Células sometidas al TRAP, cultivadas en ausencia de factores de crecimiento.
- Células sometidas al TRAP, tratadas con rhTGF- β 1 durante 14 días, más 3 días de osteoinducción con dex y β -GP.

- Células sometidas al TRAP, cultivadas con rhTGF- β 1-F2 durante 14 días, más 3 días de osteoinducción con rhBMP-2, dex y β -GP.

El número de células a implantar fue de 106 por cámara de Dch y de 1.5×10^6 por cámara de DBM, y los implantes se realizaron subcutáneamente en ratas hembras de 12 semanas de edad. Tras 4 semanas de implante, los animales se sacrificaron, recuperándose las cámaras para su análisis, que consistió en un estudio histológico, histoquímico e inmunohistoquímico para microscopía óptica, que nos permitió identificar las características morfológicas y estructurales del tejido que se formó en el interior de los implantes.

Los implantes extraídos de los animales se fijaron por inmersión en formalina neutra tamponada 10% (BNF 10%) (Apéndice). Tras la fijación, las piezas fueron lavadas con PBS y se deshidrataron en pasos sucesivos de etanol de gradación creciente, aclaradas en tolueno y embebidas e incluidas en parafina (Apéndice). Posteriormente, se realizaron secciones transversales de 10 μ m de grosor, que se montaron en portaobjetos y se dejaron secar a 37 °C (Apéndice).

3.4 Análisis bioquímico

Al final del PS (10 días de cultivo) se realizará un análisis bioquímico, que consiste en la determinación de ADN en los geles de colágeno, a fin de conocer el número de células; mediciones de fosfatasa alcalina (FA), una enzima de mineralización de la ruta de diferenciación pre-osteoblástica; así como de

osteocalcina (OC), una enzima específica de diferenciación osteoblástica (Andrades y cols. 1999).

Tras el PA-I (7 días más de cultivo) se volverá a realizar un análisis bioquímico de ADN y FA en los geles de colágeno. La OC se medirá en los geles y también en el medio de cultivo, pues en este momento el nivel de OC, como proteína soluble que se libera al medio, será suficientemente elevado como para ser detectado (Andrades y cols. 1999).

Para las muestras procedentes del TRAP fue necesario disgregar el gel de colágeno para liberar las células. Esto se realizó incubando con el mismo volumen de colagenasa al 0,05% durante 10 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo se paró la reacción con DMEM, añadiendo el doble del volumen usado de colagenasa (GIBCO). La suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm, se eliminó el sobrenadante y el pellet se sometió a 3 ciclos de congelación/descongelación de 10 min. Posteriormente, las células se resuspendieron en un tampón de lisis constituido por NaCl 0,15 M, NaHCO₃ 3 mM y 0,1% Triton® X-100, pH 7,4. Tras sonicar dos veces durante cinco segundos, los restos celulares se dejaron decantar durante 30 min. a 4 °C. En este punto, las muestras se pueden congelar a -20 °C hasta el momento del análisis.

Cuantificación de ADN

Para analizar la cantidad de ADN en las muestras procedentes del TRAP se utilizó el método de tinción con Hoechst. Se mezclaron 100 μ l del lisado celular con 100 μ l de una dilución 1:1000 de la solución stock de Hoechst (1 mg/ml), y se leyó en el fluorímetro a una excitación de 360 nm y emisión de 460 nm. Los datos se expresan en ng/ml de ADN.

Análisis de la expresión de FA

Para analizar la expresión de fosfatasa alcalina, a 10 μ l del lisado celular se le añadieron 100 μ l de solución de p-nitrofenol fosfato (pNPP) como sustrato y se incubó a 37 °C durante 8 minutos. La absorbancia se midió en un lector de placas de ELISA a 405 nm, tras parar la reacción con NaOH 1 N. Los valores de expresión de la enzima se representaron como concentración de p-nitrofenol en nmol/ml/minuto por ng/ml de ADN.

3.5 Implantación celular

En el caso de los cultivos adherentes, y una vez alcanzada la semiconfluencia indicada, las células se despegan y transfieren a otros frascos de cultivo en idénticas condiciones a las descritas anteriormente, hasta alcanzar un pase de cultivo 1 (p1), que es el utilizado para implantar.

Respecto a los cultivos en 3D, transcurridos los 17 días de cultivo se procederá a la implantación de las células en los animales (período de implantación, PI). Una vez liberadas las células de los geles de colágeno, éstas se centrifugan a 500 rpm durante 10 min., se cuentan y se resuspenden en medio de cultivo sin suero.

3.6 Grupos experimentales

Se usaron ratas Wistar (Charles River) de 15 semanas de edad, y 300gr de peso, distribuidas en 4 grupos experimentales de 8 animales (véase Tabla de tamaño muestral).

Grupo I. Se les realizó el procedimiento quirúrgico utilizando, para reponer el segmento reseccionado, segmentos equivalentes de hueso alogénico (de otra rata singénica), mantenidos a -80° C.

Grupo II. Se les realizó el procedimiento quirúrgico, utilizando segmentos equivalentes de HA de 2x5 mm (Prosteon 500R, Interpore), y tamaño de poro de 500 micras.

Grupo III. Se les realizó el procedimiento quirúrgico utilizando segmentos equivalentes de HA, previamente adsorbidas las MSCs en cultivo primario (p1), siendo $2,4 \times 10^6$ de células por bloque de biomaterial, en un volumen de 40 microlitros de DMEM sin suero).

Grupo IV. Se les realizó el procedimiento quirúrgico utilizando segmentos equivalentes de HA de 2x5 mm, previamente adsorbidas de células capacitadas por el TRAP sinérgico (rhTGF- β 1-F2 + rhBMP-2).

En los cuatros grupos, las ratas se identificaron marcando la oreja derecha o izquierda, realizando de 1 a 4 agujeros.

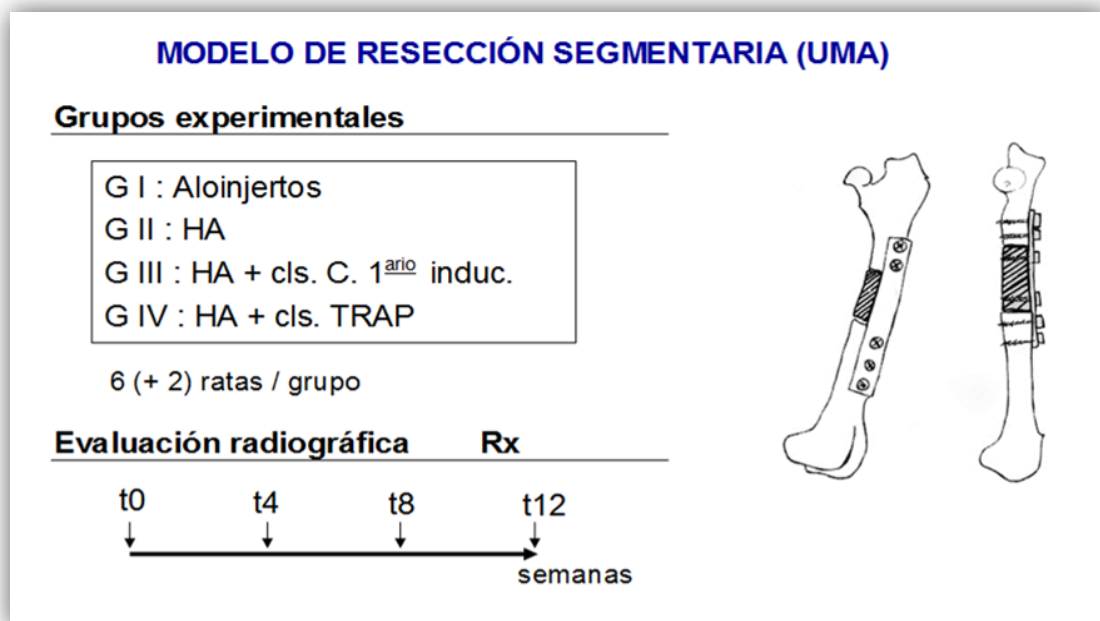


Figura 9. Grupos experimentales y calendario de estudio de Rx.

3.7 Procedimiento quirúrgico

3.7.1 Procedimiento anestésico

Por inyección subcutánea de Ketamina (Ketolar), 6 mgr/100 gr de peso y medetomidina (Domtor) a 0,04mgr/100 gr de peso (Tsuchida, 2003).

Los aloinjertos se obtendrán de los fémures de ratas del mismo sexo y edad que los animales receptores. Las piezas de hueso se congelarán a -80°C de forma aséptica hasta el momento de su implantación.

3.7.2 Técnica quirúrgica

Una vez anestesiados los animales, se posicionarán en decúbito lateral derecho, se procederá a rasurar la zona a incidir, que será lateral al fémur izquierdo, y se realizará un abordaje anterolateral entre el vasto lateral y el bíceps femoral, se diseca por planos, y se realiza hemostasia, hasta llegar a la diáfisis femoral (Figura 10). Se procederá con una microsierra oscilante a dos cortes, y extracción de un segmento de hueso de 5mm (Figura 11). A continuación, se procederá a implantar el segmento de aloinjerto previamente tallado o el bloque de HA, en su caso (Figura 12). Posteriormente, se estabilizará el sistema con una placa de osteosíntesis de 1,2mm y cuatro tornillos (TIT Profyle, Stryker Howmédica Ibérica S.L.) (Figura 13 y 14). Seguidamente, se procede al cierre de la herida por

planos, utilizando grapas estériles para la piel (Figura 15). Los animales recibieron metamizol en su agua potable para el tratamiento del dolor en los días posteriores. Las ratas se alojaron durante 12 semanas en condiciones y nutrición estándares.



Figura 10. Abordaje anterolateral, disección por planos.

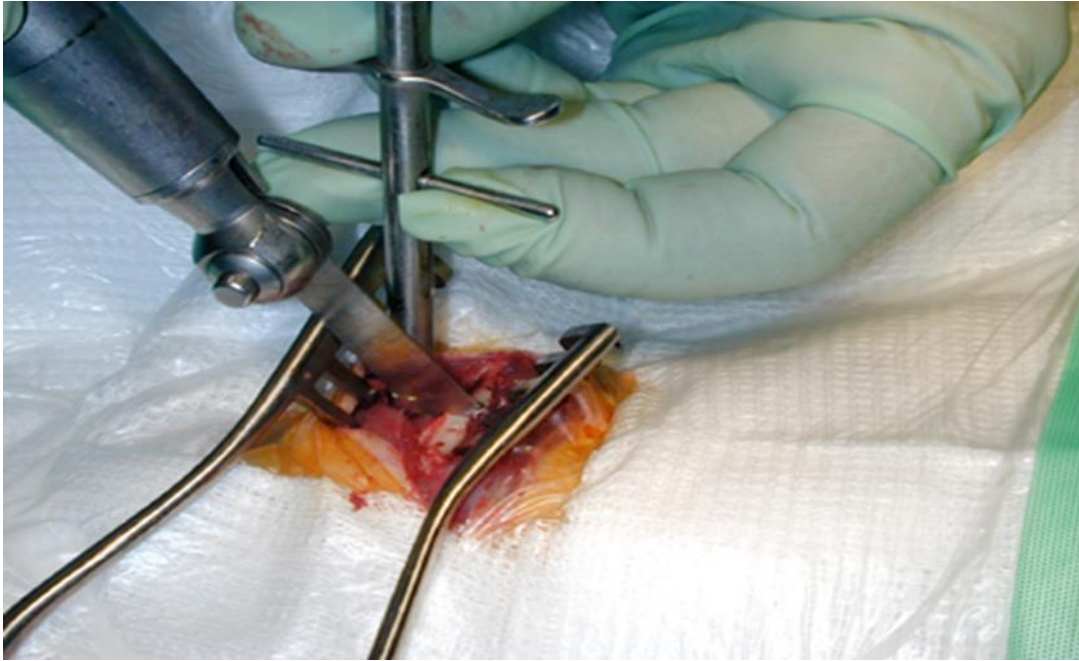


Figura 11. Corte en diáfisis femoral con sierra.

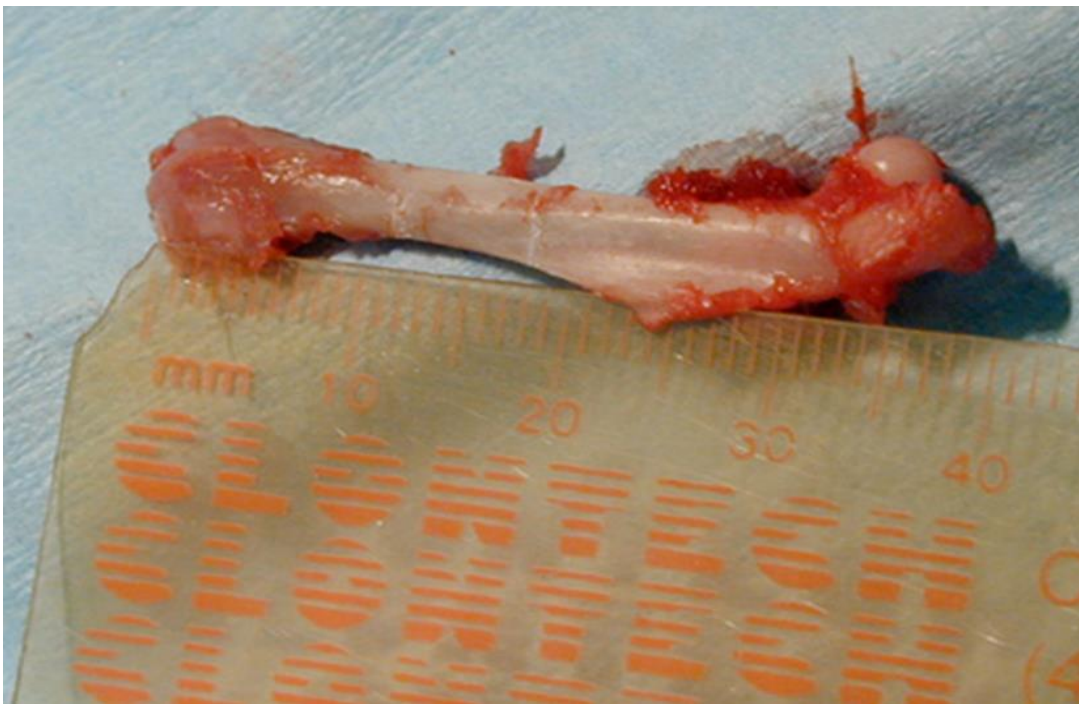


Figura 12. Marcado para cortar aloinjerto de 5mm.



Fig. 13. Reducción y estabilización con placa de osteosíntesis de 1.2 mm.

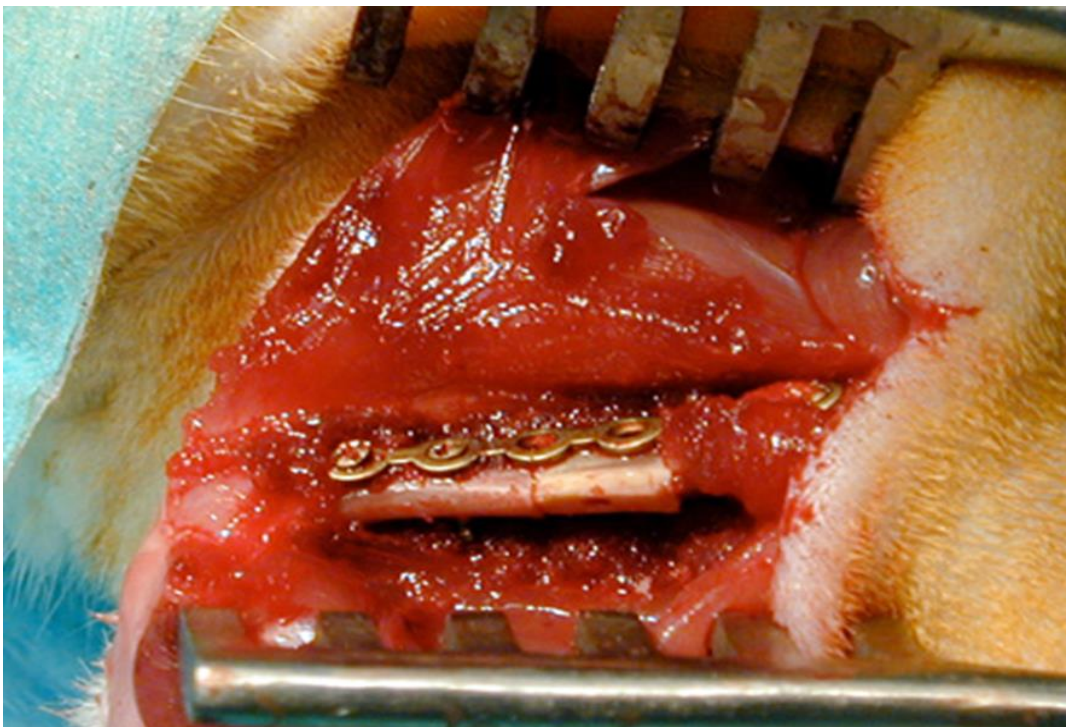


Figura 14. Placas de osteosíntesis.



Figura 15. Cierre por planos.

3.8 Estudio radiográfico

Con el fin de realizar un seguimiento de los resultados, se procederá a realizar radiografías en un generador Philips 50/65/80, con las características radiológicas siguientes: 46 Kv, 4.0 MAS, 16.2 m.s.

Concretamente, y tras la operación de implante, se tomarán radiografías a intervalos de 4 semanas, hasta un total de 12 semanas, tiempo que se considera suficiente para evaluar una posible regeneración ósea en este modelo animal (Tabla 2).

Grupo	4S	8S	12S
I	x	x	x
II	x	x	x
III	x	x	x
IV	x	x	x

Tabla 2. Calendario de Rx.

3.9 Protocolo postmortem

Tras 12 semanas de implantación se sacrifican las ratas, procediéndose a inyección mortal con pentotal sódico.

Se reseca el fémur de la rata y se desbrida de las partes blandas, y seguidamente se fija en solución Bouin Pasados unos días con el material fijado se extrae el material de osteosíntesis y se descalcifica la pieza mediante fórmico (10%) y EDTA (20%) . Posteriormente se cubren de parafina para poder realizar los cortes con microtomo. Los campos se cortarán de forma longitudinal paralelos al eje longitudinal del fémur. (Figura 16).



Figura 16. Pieza femoral postmortem.

3.10 Tratamientos de datos y análisis estadístico

3.10.1 Tamaño muestral

Para el cálculo del tamaño muestral se ha utilizado un procedimiento de cálculo de distribuciones binomiales : Binomial Power Calculations de la Universidad de California, Los Ángeles (UCLA) a través de su portal de internet::<http://ebook.stat.ucla.edu/calcul.../b-2arcsine/b-2arcsine-samp.html>. Se aceptó una potencia de 0.80 (probabilidad de aceptación de la hipótesis alternativa siendo cierta) para distintos porcentajes de éxito del procedimiento experimental. (Tabla 3).

Grupo I	Potencia	P (nivel de significación)	N(para cada grupo de comparación)
0.25	0.8	0.05	8
Grupo II			
0.25	0.8	0.05	8
Grupo III			
0.25	0.8	0.05	8
Grupo IV			
0.25	0.8	0.05	8

Tabla 3. Tamaño muestral para diferentes probabilidades de éxito del grupo experimental.

3.10.2. Análisis estadísticos de los datos.

Se realizó análisis descriptivo mediante distribución de frecuencias. Se compararon los grupos (I vs II, I vs III, I vs IV) según variables de formación de hueso, consolidación y tipo de consolidación, mediante el estadístico de Fisher, y estableciendo el nivel de significación estadística en $p < 0,05$.

3.10.3 Interpretación radiográfica.

Se realizará una comparación de los resultados del análisis de imágenes y su relación con el estándar de oro que será la histología. Se estimará la validez de la radiografía en términos de Sensibilidad, Estabilidad.

Capítulo IV

4. RESULTADOS

4.1 Caracterización de las células de médula ósea

4.1.1 Cultivo celular adherente

Los cultivos primarios de MSCs procedentes de médula ósea de rata se muestran, atendiendo a su morfología, generalmente homogéneos, con forma estrellada, irregulares, cuando se observan en el microscopio de contraste de fase. Tras 10 días de cultivo, las células adquirieron un fenotipo fibroblástico, con un gran citoplasma aplanado muy extendido, y con un núcleo oval con prominentes nucléolos (Figura 17).

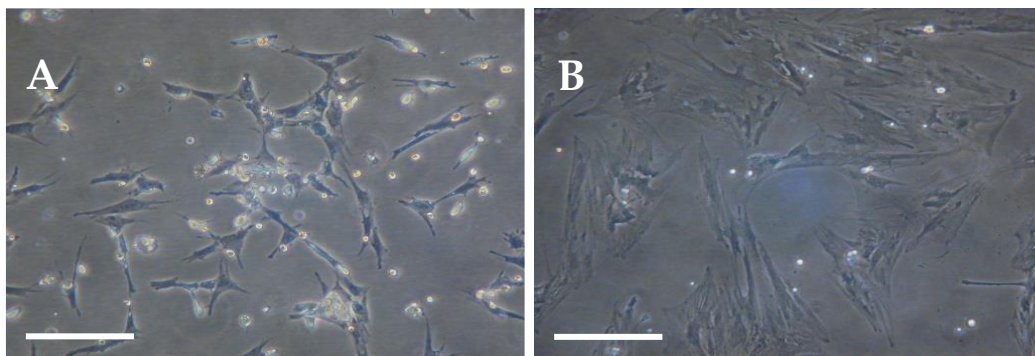


Figura 17. Cultivo primario adherente de MSCs. Fotomicrografías obtenidas por microscopía óptica de contraste de fase, tras 2 (A) y 10 (B) días de cultivo. Barra: 200 μm .

El análisis por citometría de flujo (FACS) del ciclo celular de estos cultivos primarios, muestra que las células aisladas de MO se encuentran mayoritariamente en fase activa de proliferación; es decir, un $21.7 \pm 4.9\%$ en G₀/G₁ (preparación y crecimiento celular), $73.2 \pm 5.5\%$ en S (replicación del ADN), y $5.2 \pm 0.6\%$ en G₂/M (síntesis de orgánulos y división celular) (Figura 18).

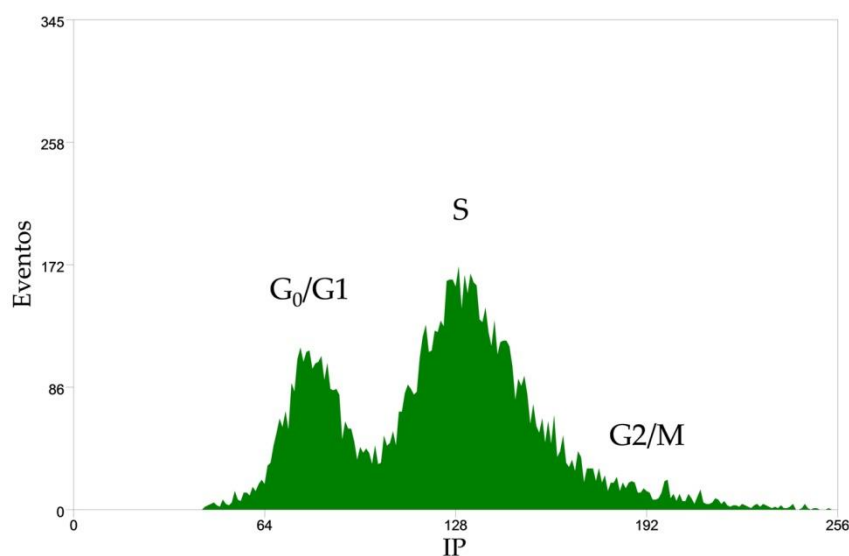


Figura 18. Análisis por FACS del ciclo celular mediante tinción con ioduro de propidio.

Por su parte, la caracterización fenotípica de las mismas células evidenció la expresión de receptores de superficie celulares típicamente descritos para las MSCs (Figura 19). Así, dichas células resultaron negativas para los

antígenos típicamente hematopoyéticos CD34 y CD45, además de para CD44 (0.05%+/-0.06). En cambio, mostraron positividad para los antígenos CD29 (27.3%+/-24.3), CD73 (8.75%+/-11.27), CD105 (24.83%+/-20.16), CD166 (29.07%+/-23.21), el antígeno HLA-I (24.31%+/-21.32) y Stro-1 (24.91%+/-20.54).

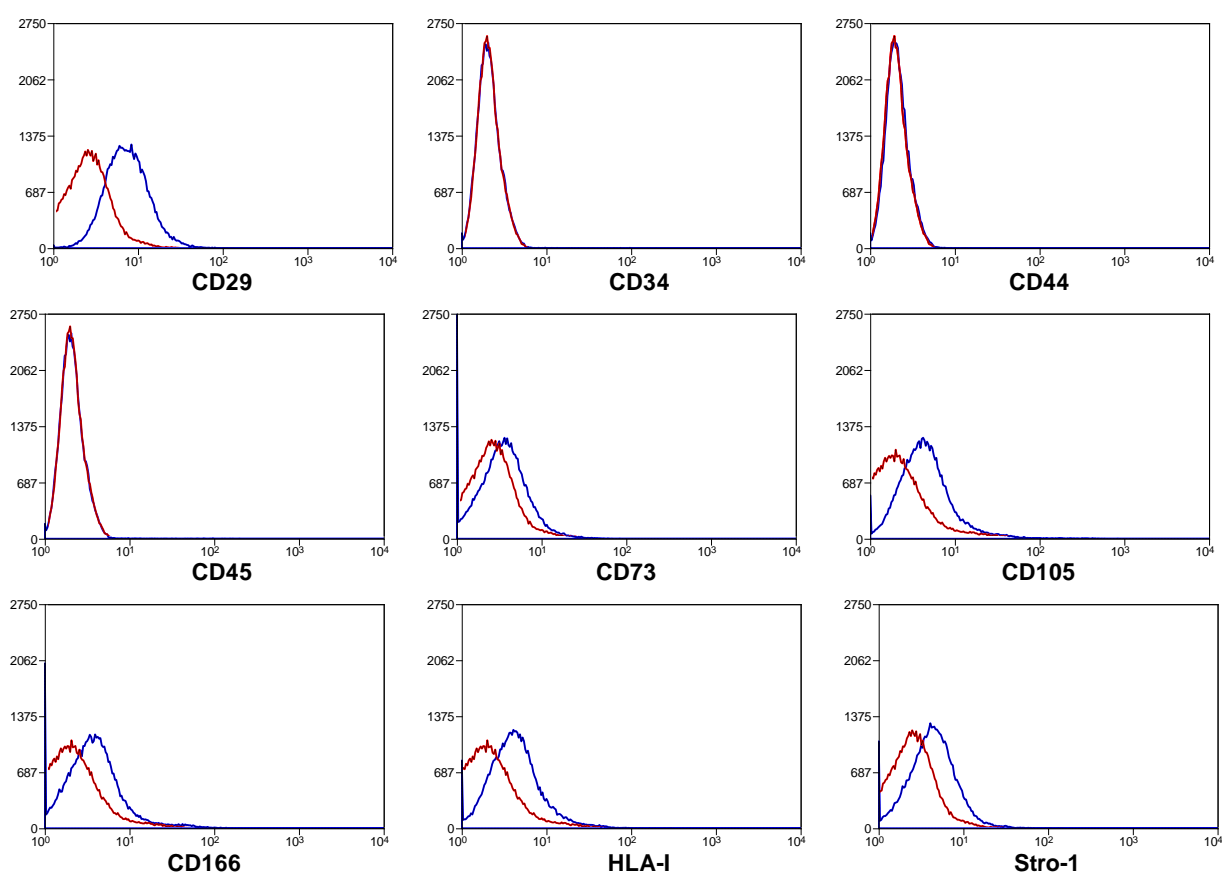


Figura 19. Análisis del perfil fenotípico celular mediante FACS en cultivo adherente.

Tras ser subcultivadas, estas células presentan un gran potencial de expansión, ya que la primera fase de crecimiento rápido se ralentiza cuando alcanzan el noveno pase. No obstante, existe cierta variabilidad que puede deberse a varios determinantes, entre otros el procedimiento usado para la obtención de la médula e idiosincrasia propia del donante del que se toma la MO.

4.1.2 Cultivo celular en gel de colágeno (3D ó TRAP)

Respecto a la caracterización fenotípica de las células capacitadas mediante el TRAP, a día 10 (PS) se observaron distintas poblaciones celulares, unas con características del linaje hematopoyético (CD34+ CD45+), otras del mesenquimal (CD29+ CD105+ CD166+ CD271+ STRO-1+) y otras del endotelial (CD34+ CD133+ pero CD45-). Estas células CD133+ son de gran interés ya que pueden diferenciarse en células endoteliales maduras, contribuyendo a la neovascularización, fundamental para el proceso de reparación ósea (Figura 20).

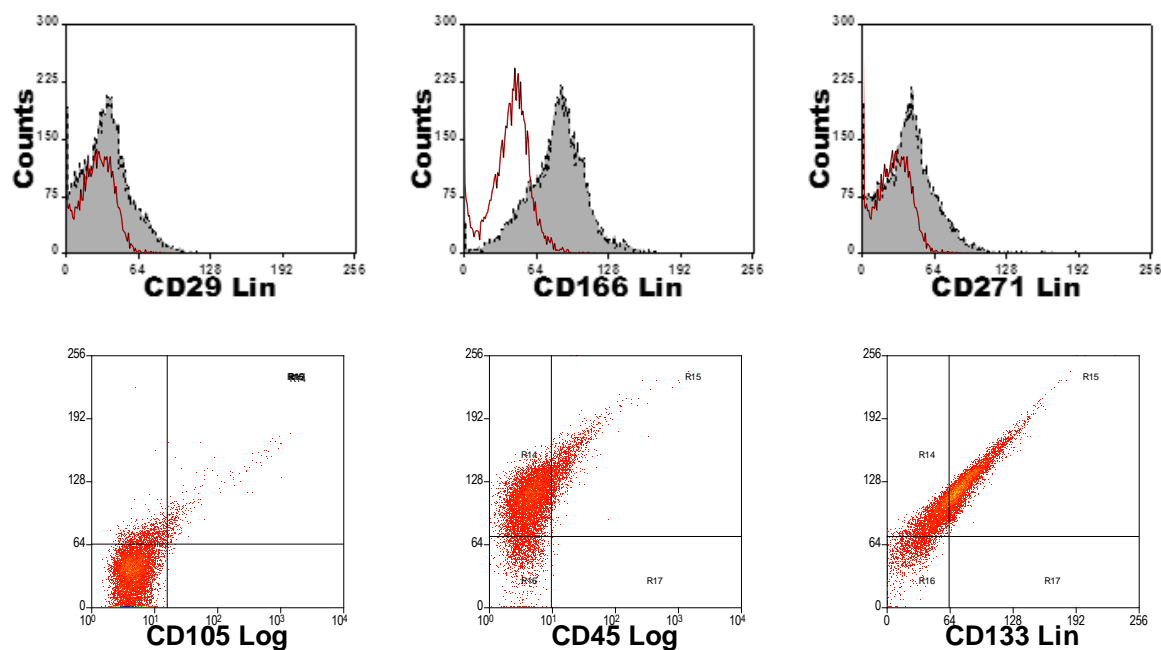


Figura 20. Análisis del perfil fenotípico celular mediante FACS en cultivo 3D a los 10 días (PS).

Al comparar los cultivos del TRAP a día 10 y 17 (PA-I), se hallaron ciertas diferencias (Figura 21). La población CD45+ disminuyó con el tiempo. Lo mismo se observó con la CD166+, lo que indica que al estar incluidas dentro de una matriz tridimensional no necesitan una molécula de adhesión como es el ALCAM. Por el contrario, se obtuvo un incremento en la eexpresión de algunos marcadores de células mesenquimales como CD29, CD271 y STRO-1. Además se vio cómo la población de precursores endoteliales disminuyó (CD34+ CD133+).

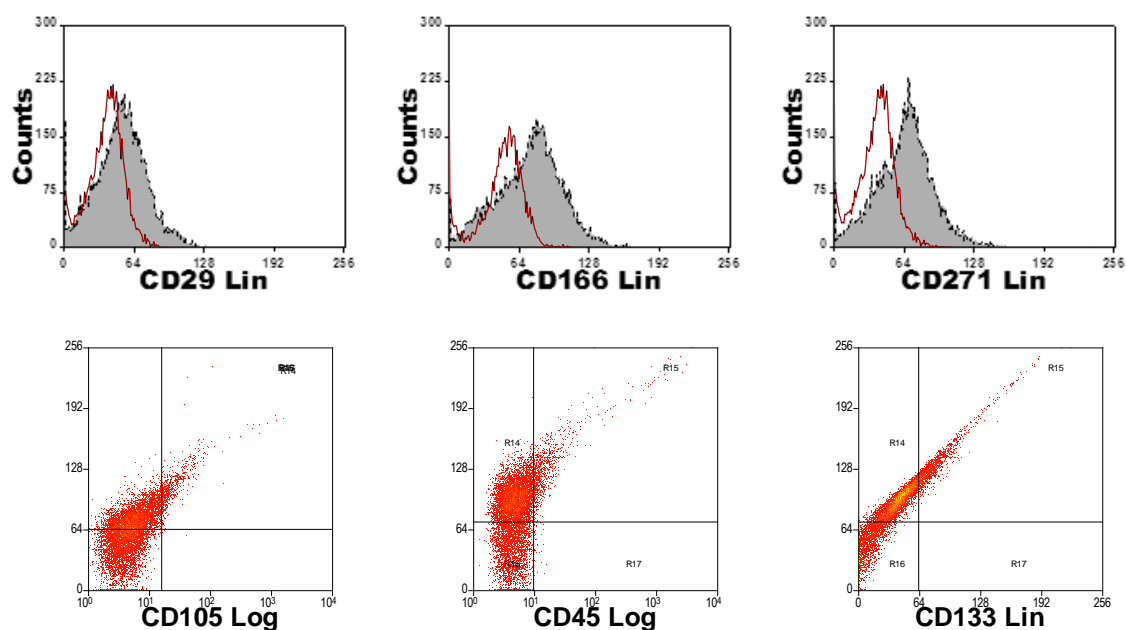


Figura 21. Análisis del perfil fenotípico celular mediante FACS en cultivo 3D a los 17 días (PA-I).

El cultivo celular formó por una población de células redondas pequeñas uniformemente distribuidas y embebidas en la matriz de colágeno; el número de células decreció drásticamente como consecuencia del período de inanición para los 10 primeros días (Tabla 4). Una vez que se restablecieron las condiciones normales de suero, las células seleccionadas comenzaron a proliferar, ya sea en presencia o ausencia de rhTGF- β 1-F2. Sin embargo, el número de células cosechadas a partir de cultivos tratados con rhTGF- β 1-F2 en el día 14 y 17 fue significativamente mayor ($p < 0,05$ y $P < 0,01$, respectivamente) en comparación con los controles (ausencia de factor de crecimiento exógeno). En cultivos inducidos también con un

pulso de rhBMP-2 a los 14 días se obtuvieron ligeramente menor número de células, sólo significativamente diferente en comparación con el grupo control rhTGF- β 1-F2-tratado ($p < 0,05$ en el día 17). En relación a la expresión de FA, este enzima de premineralización comienza a expresarse tras los primeros días de amplificación, aunque sus valores mayores se obtienen al final del período de osteoinducción, lo que también ocurre con la expresión del enzima osteocalcina, tanto en el gel como en el medio de cultivo sobrenadante.

DIAS DE CULTIVO

	0	10	14	17
ADN (ng/ml)	1700	950	1450	1100
FA (nmol/min/ml/AND ng/ml)	ND	ND	520	1300
OC (ng/ μ g ADN) gel/medio	ND/ND	ND/ND	0.51/0.62	1.22/0.88

Tabla 4. Comportamiento de ADN, FA y OC. ND (no se detecta).

Bajo un microscopio óptico de contraste de fase, estas células cultivadas con rhTGF- β 1-F2 (en ausencia o presencia de rhBMP-2) muestran aumento en tamaño, y se evidencia una formación de colonias bien definidas al final del período de inducción (PI) (Figura 22). Células cultivadas bajo condiciones de control (ausencia de factor de crecimiento) nunca formaron colonias y el aspecto de los geles era de abundante muerte celular (datos no mostrados).

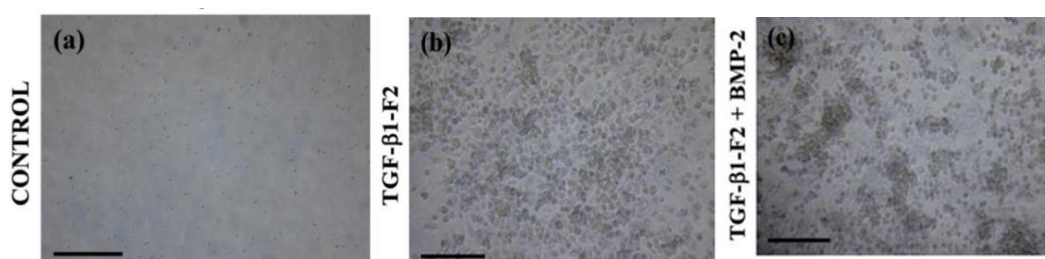


Figura 22 Cultivos 3D en gel de colágeno. Micrografías obtenidas por microscopía óptica de contraste de fase. Cultivos en ausencia del factor de crecimiento (a); cultivos de células en presencia de rhTGF- β 1-F2 durante 14 días (PS y PA); y cultivos de células en presencia de rhTGF 1-F2 durante 14 días (PS y PA) y pulso de rhBMP-2 durante 3 días (PI) (c)

4.2 Implantes ectópicos

En relación a la capacidad condro/osteogénicas de las células capacitadas *in vitro* mediante el TRAP, tras las 4 semanas que duró el período de implantación ectópica, se extrajeron las cámaras y se procesaron para su estudio histológico, lo que nos permitió identificar la naturaleza del tejido formado y diferenciar si se trataba de cartílago, hueso o ambos, e incluso en qué estado de madurez se encontraban.

En las cámaras de DBM, la imagen general muestra la formación de grandes placas de un tejido de características similares al hueso trabecular (Figura 23, A-F), que aparece vascularizado y con numerosas cavidades que pudieran corresponder a MO. El estudio en detalle de la matriz ósea en formación, muestra numerosos osteoblastos estrechamente relacionados con el hueso maduro (puntas de flecha en la Figura 23, E), que se distinguen por ser células de mayor tamaño con un gran núcleo y alineadas en los bordes de las placas ósea en formación. Esta misma imagen visualizada con luz polarizada muestra una distribución ordenada de las fibras de colágeno propia de un hueso maduro (Figura 23, F). La tinción con el colorante azul de toluidina (Figura 23, B), que produce la metacromasia en el tejido cartilaginoso, muestra la ausencia de restos de proteoglucanos sulfatados, lo que puede indicar que el origen del hueso sea intramembranoso.

El análisis inmunohistoquímico también reveló la presencia de colágeno tipo I, con lo que se puede afirmar que se trata de tejido óseo. Además, se observan condensaciones de células muy inmunorreactivas bordeando el hueso, que deben corresponder a los osteoblastos que están sintetizando la nueva matriz ósea (puntas de flecha en la Figura 23, D).

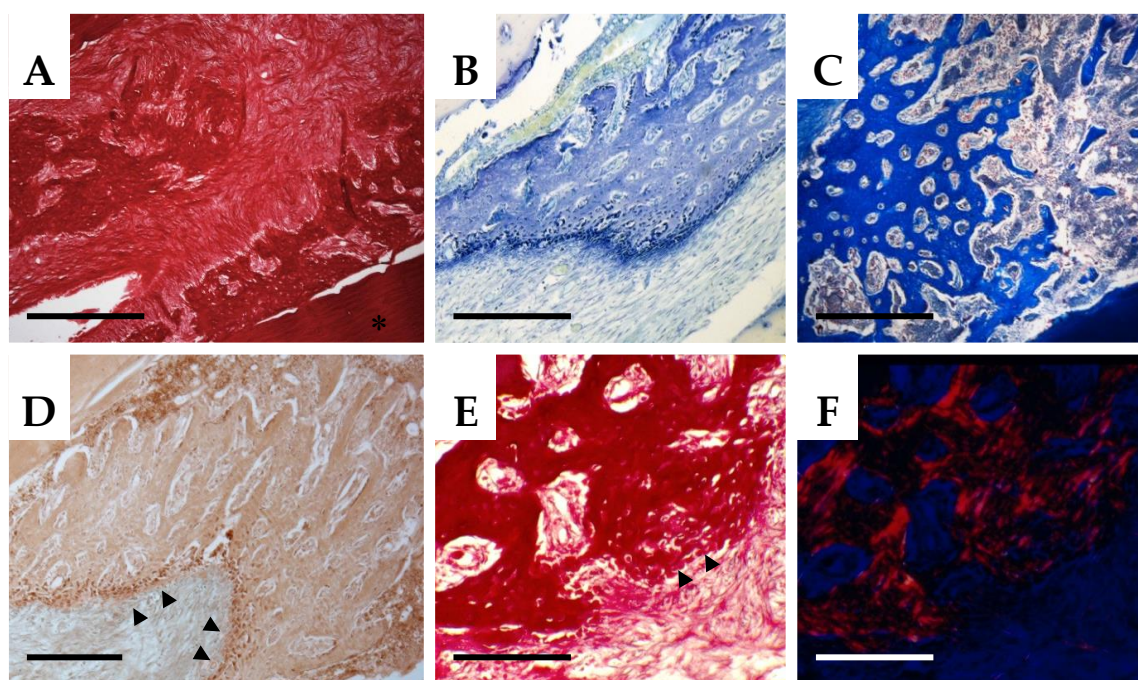


Figura 23. Estudio histológico de los implantes con células del TRAP en cámaras de DBM a 4 semanas. Las técnicas utilizadas son picrosirio-hematoxilina en campo claro (A, E) y con luz polarizada (F), azul de toluidina (B), tricrómico de Goldner (C), e inmunohistoquímica frente al colágeno I (D). Los asteriscos indican las paredes de la cámara. Las puntas de flecha marcan los osteoblastos. La aparición de un tejido trabecular a las 4 semanas es evidente. Barras: 100 μ m en (A-C, E, F), y 500 μ m en (D).

Respecto a las cámaras Dch, la Figura 24, B es un detalle de la zona 1 (picrosirio-hematoxilina) teñida con tricrómico de Goldner, que permite comprobar el grado de madurez del tejido. Esta misma zona presenta poca afinidad por el azul de toluidina (Figura 24, C), lo que nos indica que se trata de matriz ósea.

En cambio, aparecen implantes donde puede apreciarse la formación de distintos tipos de condensaciones tisulares, localizadas cerca de los filtros (asteriscos) y rodeadas de tejido fibroso (Figura 24, D). La Figura 24, E es un detalle de la zona 2, que presenta gran afinidad por el azul alciano y el azul de toluidina, y es inmunorreactiva frente al colágeno tipo II (Figura 24, F-G). En cambio, la zona 3 de la Figura 24, D se corresponde con uno de los nódulos que se han formado en el interior de la cámara, y que presentan las características morfológicas de un tejido óseo de madurez intermedia, donde aún se aprecian restos de tejido cartilaginoso (Figura 24, H-I). En la Figura 24, J-L también se observa cómo el tejido óseo se forma en contacto con el filtro, mientras que el cartílago se sitúa hacia el interior de la cámara. Probablemente, esto debe estar relacionado con la situación nutricional de las diferentes regiones de la cámara.

La tinción con von Kossa muestra como esa región del implante que es inmunorreactiva frente al colágeno tipo I (Figura 24, L) se encuentra intensamente calcificada (Figura 24, J).

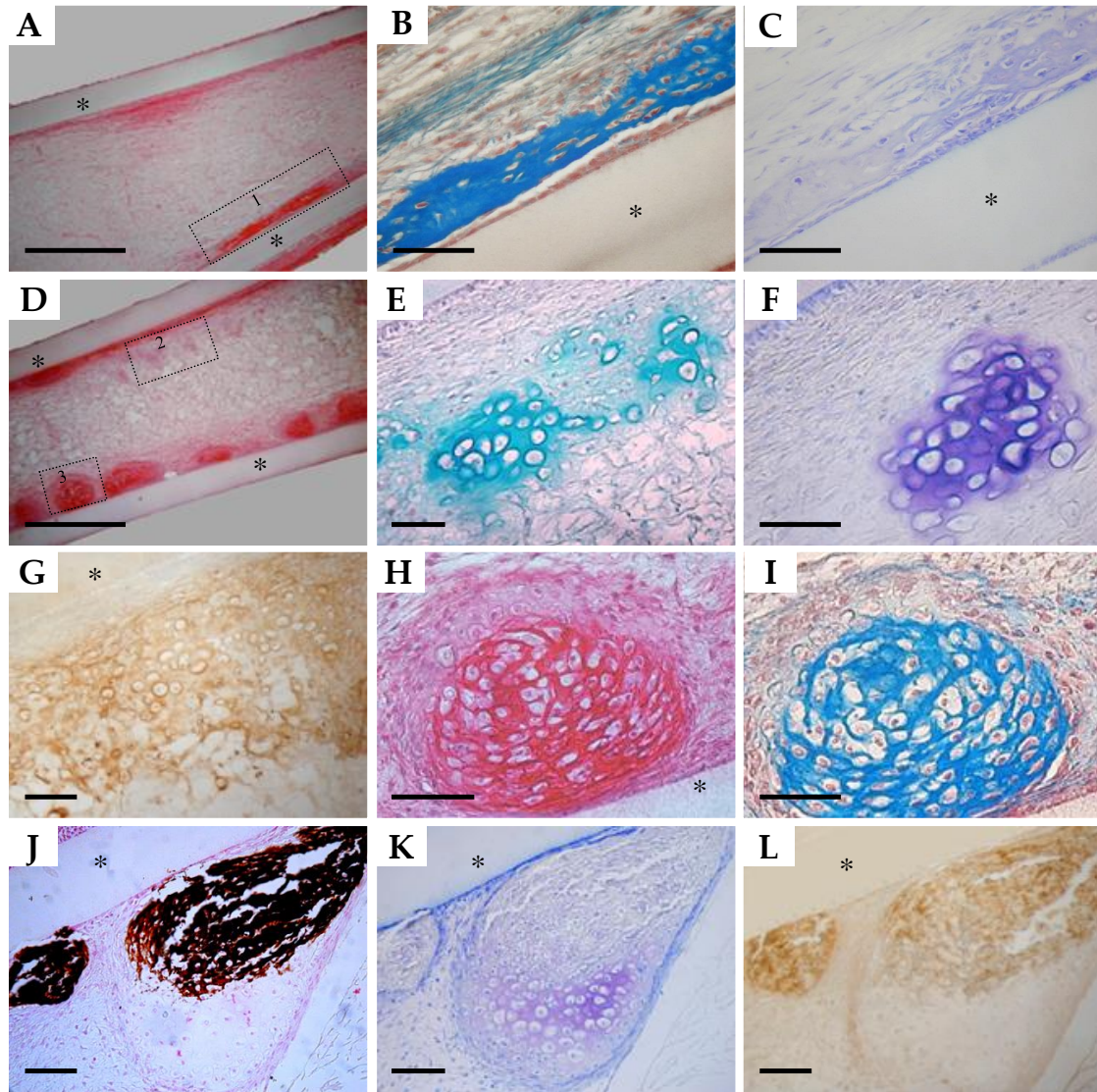


Figura 24. Estudio histológico de los implantes con células del TRAP y pulso de rhBMP-2 en cámaras de difusión a 4 semanas. Las técnicas utilizadas son picrosirio-hematoxilina en campo claro (A, D, H), azul de toluidina (C, F, K), azul alciano (E), tricrómico de Goldner (B, I), von Kossa (J), e inmunohistoquímicas frente al colágeno I (L) y colágeno II (G). Los asteriscos indican los filtros de las paredes de la cámara. La aparición de un tejido óseo y cartilaginoso hialino a las 4 semanas es evidente. Barras: 100 μm en (B, C, E-I), y 500 μm en (A, D).

4.3 Implantes femorales

El procedimiento quirúrgico bajo anestesia general fue llevado a cabo sin complicaciones, ni fallecimientos en las cirugías o durante el período de estudio. Durante el seguimiento en las doce semanas siguientes, como complicación tuvimos una fractura de fémur abierta, donde uno de los segmentos de la fractura perforó la piel.

Grupo I

En el grupo I, donde se implanta el aloinjerto en la diáfisis femoral derecha de 8 ratas, a nivel radiográfico a las 12 semanas, se observa una buena integración del implante (Figura 25).

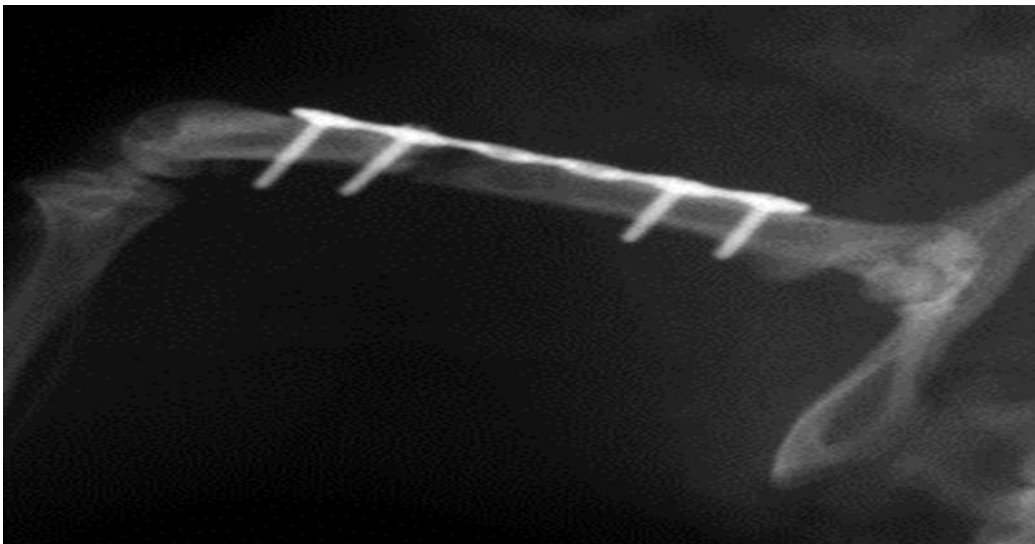


Figura 25. Estudio radiográfico a las 12 semanas del implante femoral, con autoinjerto y estabilización mediante placa de osteosíntesis y 4 tornillos.

Como muestran los controles radiológicos, se observa una buena evolución radiográfica del aloinjerto. Este hecho, que indicaría una fusión del aloinjerto con el hueso receptor, se confirma con la histología, donde, observamos una buena fusión entre el aloinjerto y el hueso receptor, marcado por una línea cementante bien definida. Las lagunas osteocíticas del hueso implantado se encuentran vacías (Figura 26).

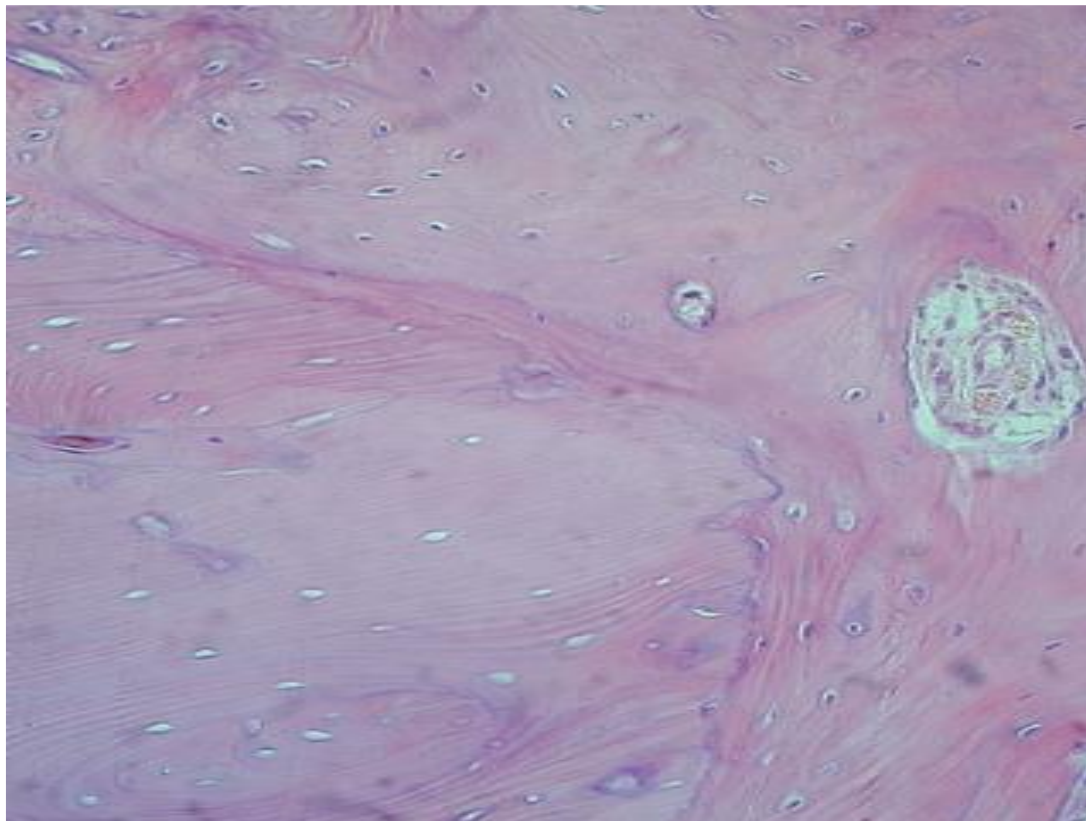


Figura 26. Estudio histológico a las 12 semanas del implante femoral con autoinjerto. Se observa la línea cementante (aloinjerto en el margen inferior izquierdo). Tinción con hematoxilina-eosina (x300).

A nivel histológico, el segmento consolidado aporta un frente de abundante cartílago hialino maduro, con buena integración e imbricación en el hueso receptor, así como una matriz osteoide neoformada. En el frente con aportación de cartílago fibroso, se observa remodelación osteoclástica (Figura 27). Se observan perfiles de grupos isógenos que indican la reciente formación del tejido y, por el contrario, no aparece cartílago hipertrófico. Esta región, más distal, correspondería al frente no fusionado.

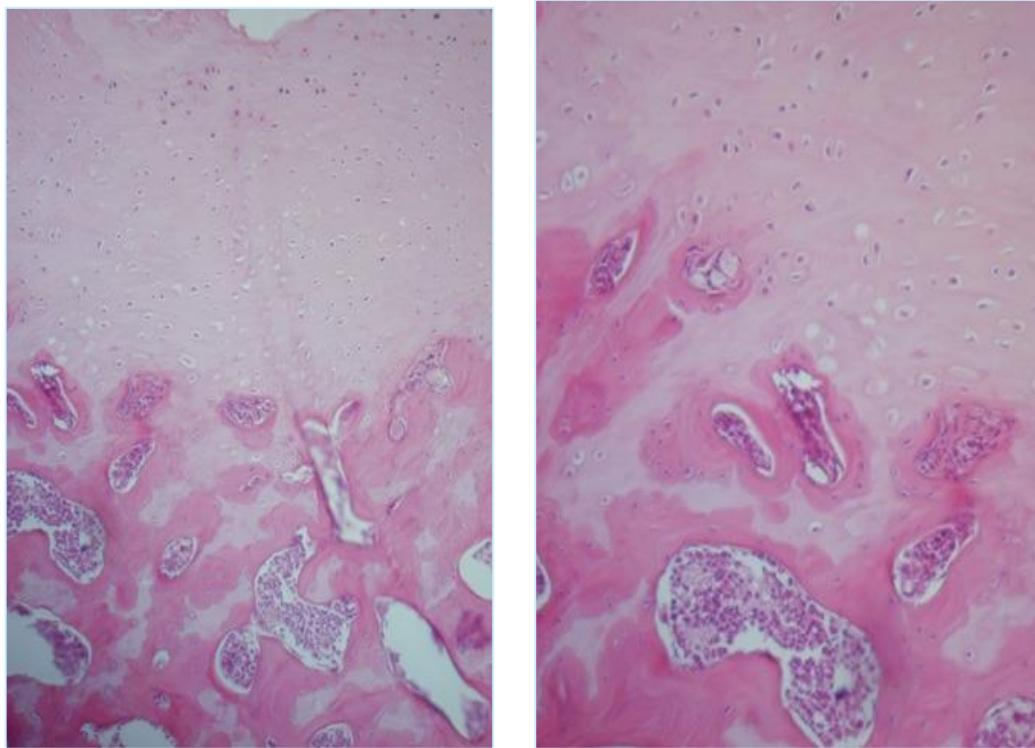


Figura 27. Estudio histológico a las 12 semanas del implante femoral con autoinjerto. Se observa abundante formación de cartílago hialino y matriz osteoide (imagen derecha es detalle de la izquierda). Tinción con hematoxilina-eosin(x150, x200, respectivamente).

Apoyándonos en las evidencias que nos ofrecen, por un lado, la tinción con picrosirio-hematoxilina para colágeno, con la que se evidencia el cartílago hialino formado (colágeno II) y el hueso receptor (colágeno I; rojo claro equivale a hueso maduro, y rojo intenso a osteoide por remodelación del anterior), y por otro, la tinción con tricrómico de Goldner, que marca de azul intenso las fibras colagénicas del hueso maduro (y de manera pálida las fibras colagénicas del cartílago), podemos determinar la presencia de abundantes frentes de remodelación ósea, apoyados por alta actividad celular en la zona (Figura 28).

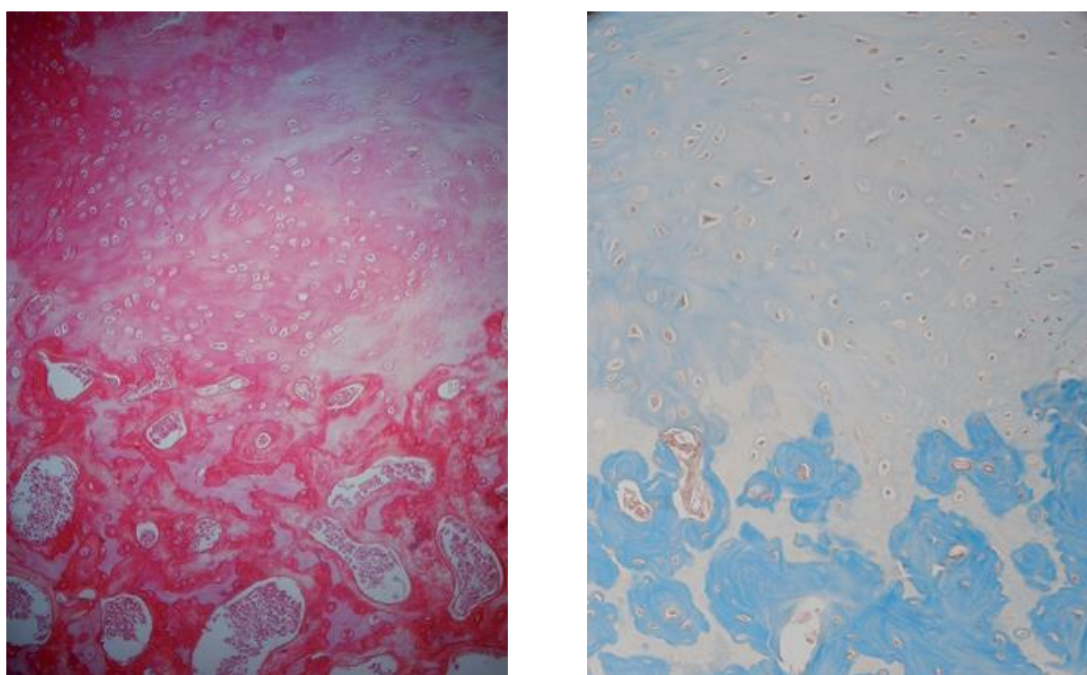


Figura 28. Estudio histológico a las 12 semanas del implante femoral con autoinjerto. Se observa abundante formación de cartílago hialino y tejido óseo en distinto grado de maduración, rodeando lagunas medulares. Tinción con picrosirio-hematoxilina (izquierda, x150), y tricrómico de Goldner (derecha, x200).

Grupo II

En el grupo II, donde se implanta un bloque de HA *Prosteon Implant 500R*, de 500 micras de tamaño de poro, en la diáfisis femoral derecha de 8 ratas, a nivel radiográfico a las 12 semanas, se observa rotura de todas las placas de osteosíntesis (Figura 29).

En las imágenes histológicas se observa ausencia de cartílago o hueso en torno a los orificios de la HA, en todos los explantes rescatados, así como abundante tejido fibroso medianamente organizado ocupando el interior de todos los implantes (Figura 30).

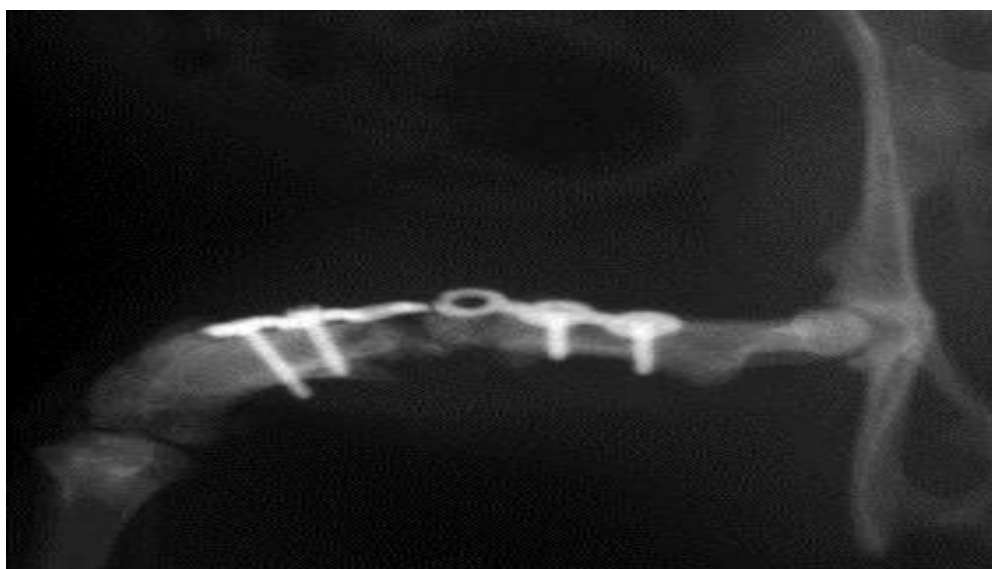


Figura 29. Estudio radiográfico a las 12 semanas del implante femoral con HA y estabilización mediante placa de osteosíntesis y 4 tornillos. La placa aparece rota. x12

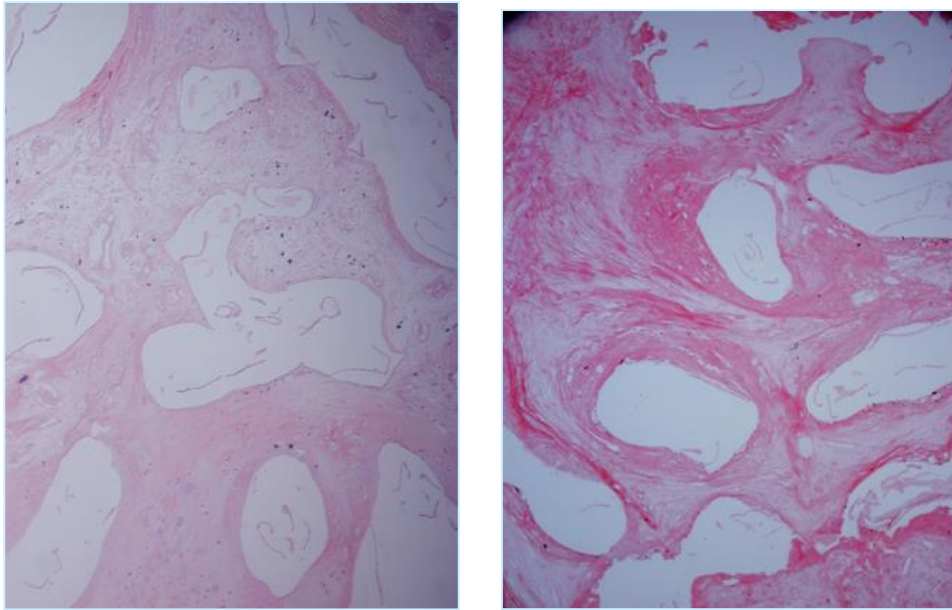


Figura 30. Estudio histológico a las 12 semanas del implante femoral con bloque de HA abundante tejido fibroso. Tinción con HE (izquierda, x100) y PS-H (derecha, x100).

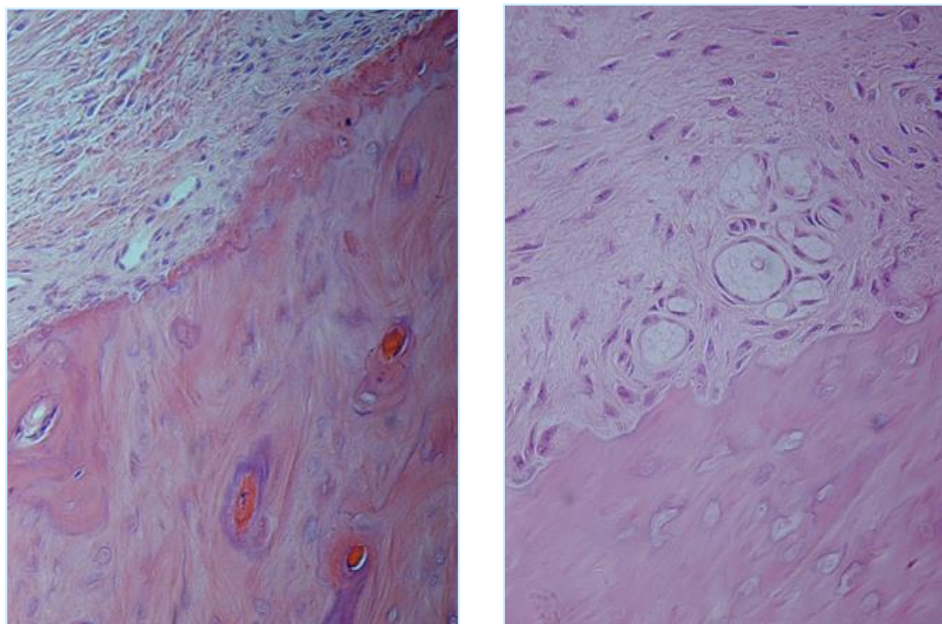


Figura 31. Estudio histológico a las 12 semanas del implante femoral con bloque de HA. Se observa la zona de no unión-hueso receptor, y tejido fibroso formado en ese frente. Tinción con HE (izquierda, x200 y derecha, x300).

Apoyándonos en las evidencias que nos ofrece el estudio histológico con las tinciones de HE y PS-H, donde sólo encontramos tejido fibroso (Figura 31), podemos determinar la nula capacidad osteoinductiva de las condiciones tisulares que rodean al bloque de HA sin células.

Grupo III

En el grupo III se implantan 8 bloques de HA, con 2,4 millones de MSCs cada uno, procedentes de un cultivo primario en el paso 1 (p+1) (Figura 33), de MO de rata hermana consanguínea de primera generación, en la diáfisis femoral derecha de 8 ratas.

A nivel radiográfico, a las 12 semanas observamos la rotura de todas las placas de osteosíntesis (Figura 32).

A pesar de ello, los resultados histológicos muestran una óptima integración del implante en uno de los dos frentes de la resección, así como una excelente ocupación del bloque de HA por cartílago hialino (Figura 34), y matriz osteoide en torno a los poros (Figura 35). Se muestra una remodelación ósea en el frente fusionado siguiendo un patrón de osificación endocondral, tomando como molde el cartílago hialino previamente originado.

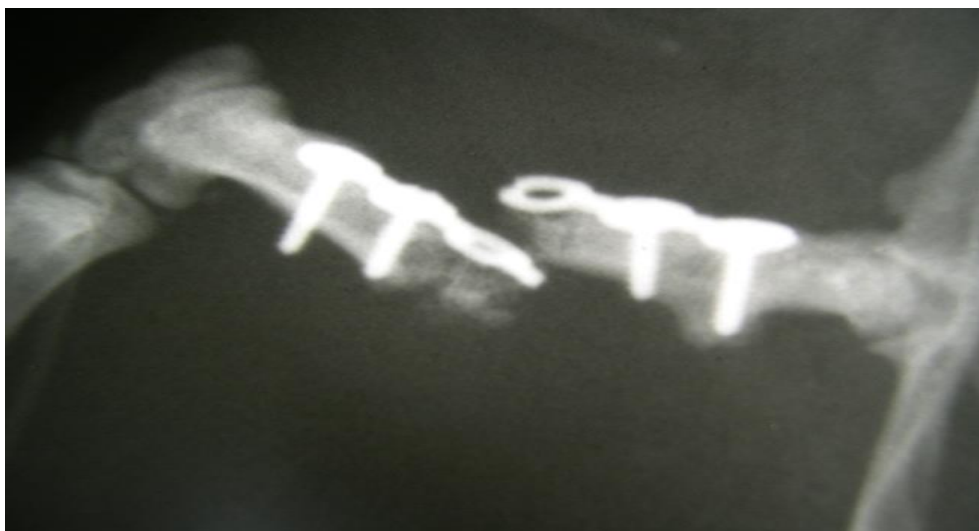


Figura 32. Estudio radiográfico a las 12 semanas del implante femoral con HA+MSCs, y estabilización mediante placa de osteosíntesis y 4 tornillos. La placa aparece fracturada. x12.

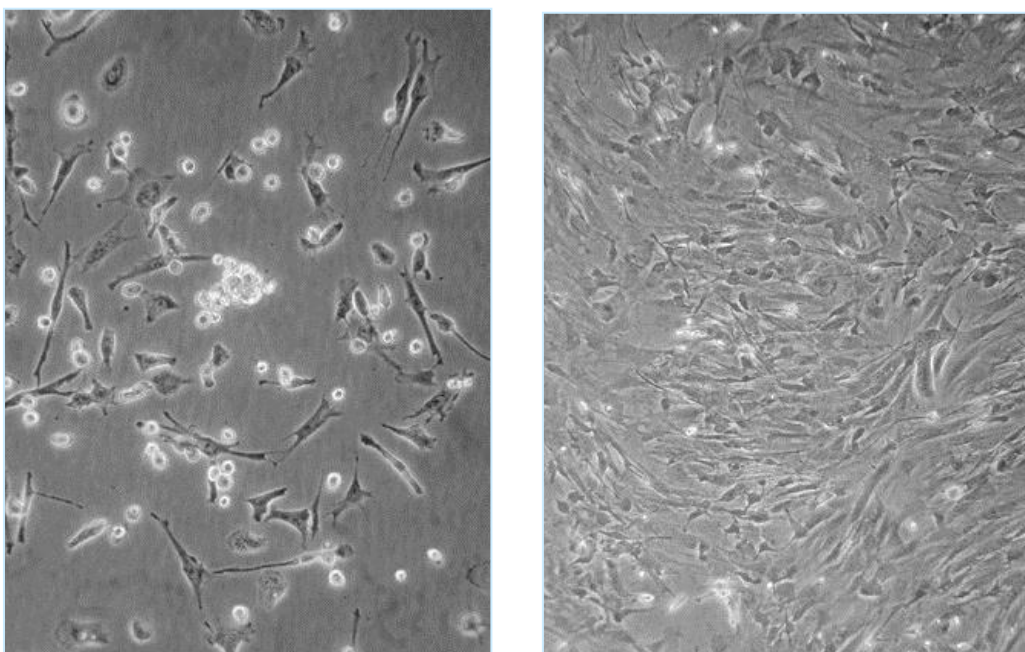


Figura 33. † Cultivo primario de MSCs en fase (p+1) a una semiconfluencia del 30% (izquierda) y 95% (derecha). Este estado del cultivo es el utilizado para el implante femoral. x400.

Apoyándonos en las evidencias que nos ofrecen, por un lado, la tinción con azul alciano, donde se evidencia el cartílago (Figura 34) y, por otro, la tinción con tricrómico de Goldner (Figura 35), que marca de azul intenso las fibras colagénicas del cartílago, y de rojo el hueso neoformado, podemos afirmar que la adición de MSCs en cultivo primario, es una condición apropiada de para formar hueso maduro, ocupando el interior de los bloques de HA.

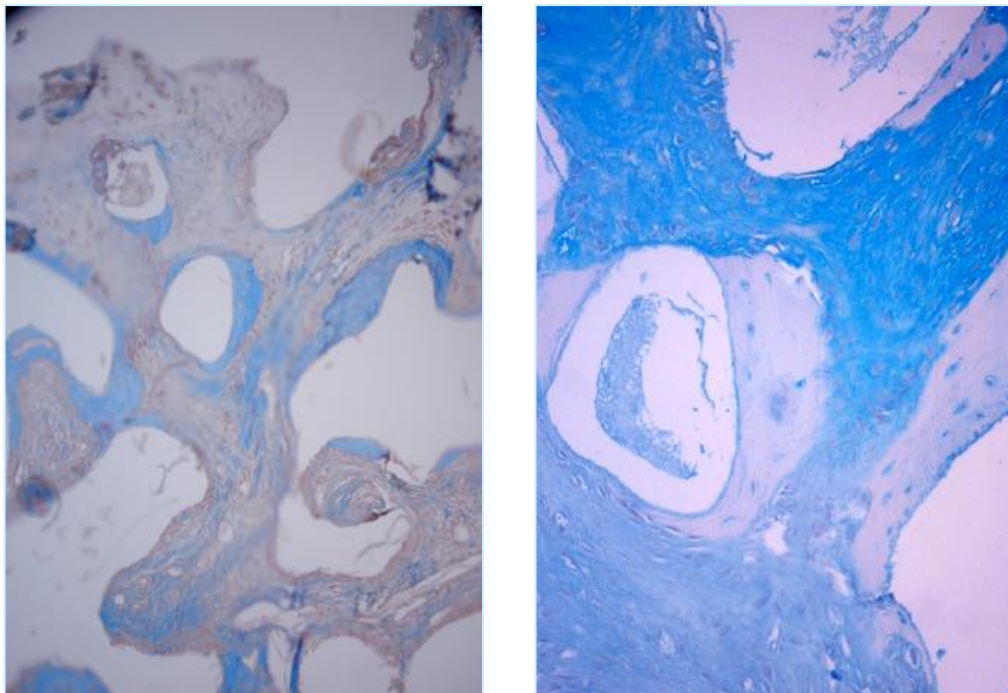


Figura 34. Estudio histológico a las 12 semanas del implante femoral con bloque de HA+MSCs. Es notable la abundante formación de cartílago hialino en amplios espacios dejados por los poros del biomaterial. Tinción con TG (izquierda, x150) y AA (derecha, x 200).

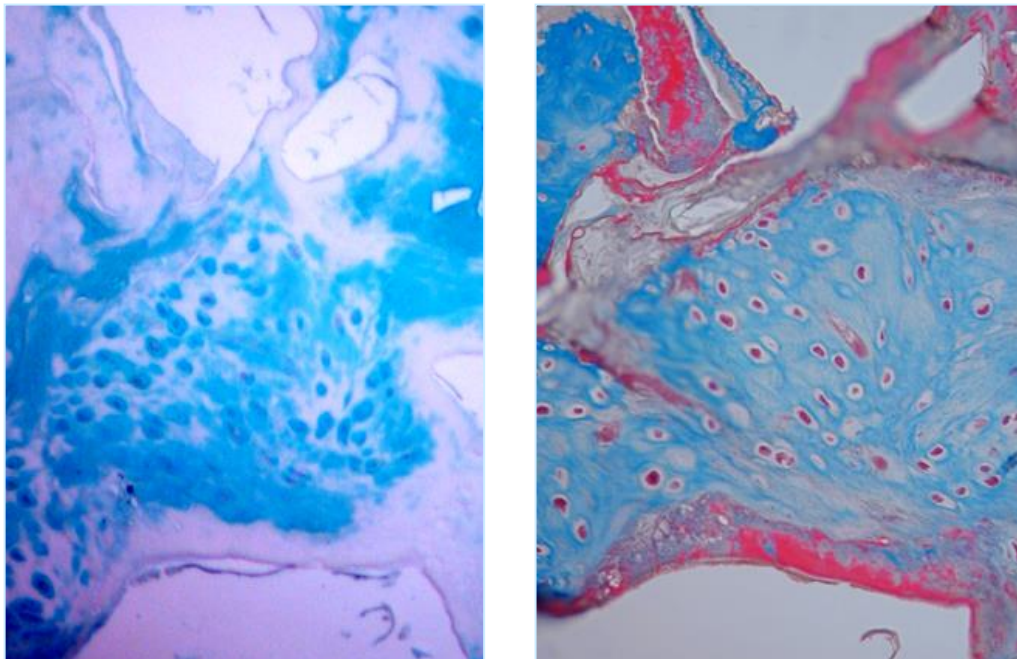


Figura 35. Estudio histológico a las 12 semanas del implante femoral con bloque de HA+MSCs. El tejido formado en el interior de los poros del biomaterial tiene características evidentes de cartílago hialino (azul), con abundantes condrocitos homogéneamente distribuidos. En los márgenes de este tejido, se forma matriz osteoide (rojo). Tinción con AA (izquierda, x300) y TG (derecha, x300).

Grupo IV

En el grupo IV, se implantan 8 bloques de HA, con 2,4 millones de células cada uno, procedentes de la capacitación hacia el linaje osteogénico llevado a cabo en el TRAP (Figura 33), en la diáfisis femoral derecha de 8 ratas. En este grupo los cultivos fueron tratados con un pulso de rh-BMP2 para favorecer la osteoinducción.

A nivel radiográfico a las 12 semanas, observamos que los implantes soportaron la fatiga mecánica sin rotura de material, aunque no se obtienen imágenes de verdadera consolidación en ninguno de los tratamientos a las 12 semanas (Figura 36).

Desde el punto de vista histológico, todos los implantes se comportaron de manera homogénea, generando abundante tejido condroide con núcleos de osteoinducción, alta celularidad y presencia regular de fibras de colágeno I, como evidencian las tinciones de HE (Figura 37) y TG (Figuras 38 y 39).

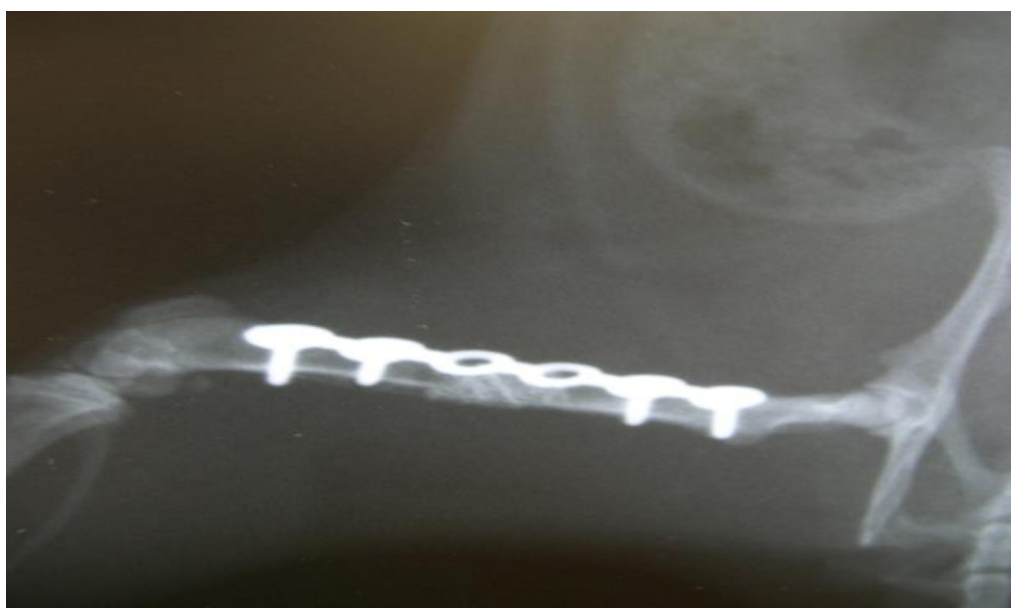


Figura 36. Estudio radiográfico a las 12 semanas del implante femoral con HA+MSCs capacitadas mediante el TRAP, y estabilización mediante placa de osteosíntesis y 4 tornillos. Se observa consolidación en el lado medial de la unión HA-hueso receptor del huésped, y no consolidación en el lado lateral. x12.

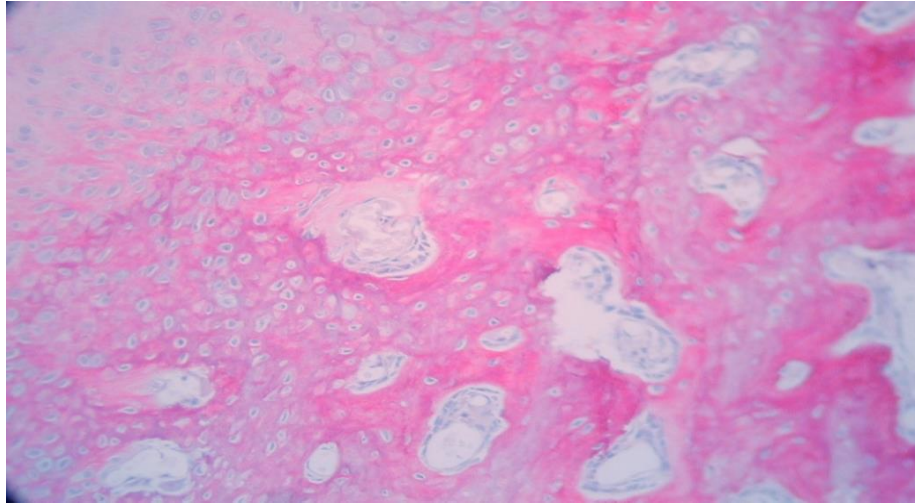


Figura 37. Estudio histológico a las 12 semanas del implante femoral con bloque de HA+MSCs capacitadas mediante el TRAP. El tejido formado en el interior de los poros del biomaterial tiene características evidentes de hueso, tanto en forma de osteoide (rosa intenso) como de matrix madura (rosa claro), entorno a lagunas medulares, con abundantes osteoblastos/osteoides homogéneamente distribuidos. Tinción con HE. x250.

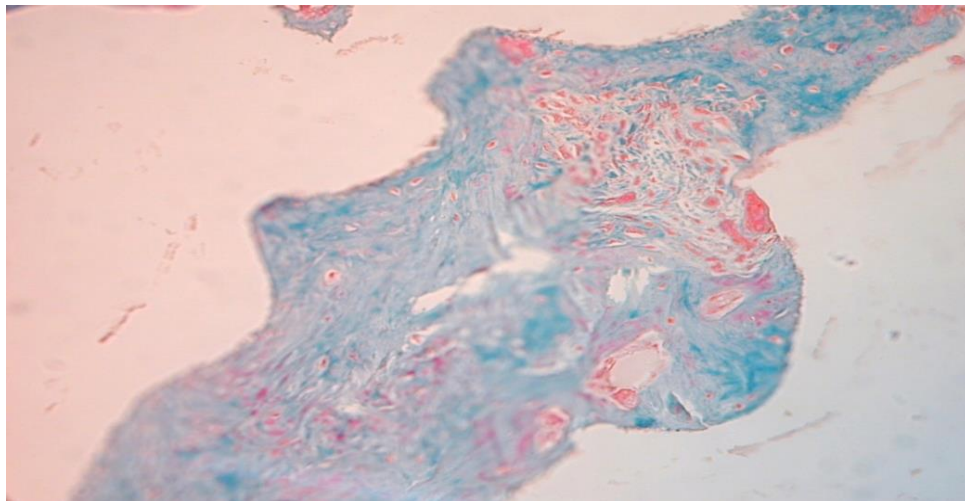


Figura 38. Estudio histológico a las 12 semanas del implante femoral con bloque de HA+MSCs capacitadas mediante el TRAP. Se observa abundante tejido condroide con núcleos de osteoinducción que originan espículas óseas (hueso neoformado). Tinción con TG. x200.

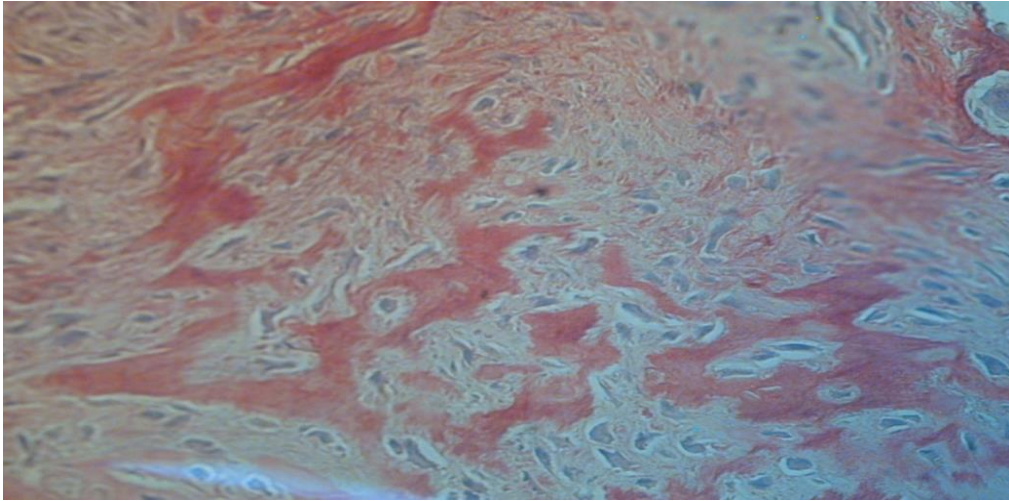


Figura 39. Estudio histológico a las 12 semanas del implante femoral con bloque de HA+MSCs capacitadas mediante el TRAP. Se observan, en detalle de la Figura 38, las espículas óseas (hueso neoformado en rojo), fibras colagénicas propias y de tejido fibroso circundante, así como abundante celularidad. Tinción con TG. x300.

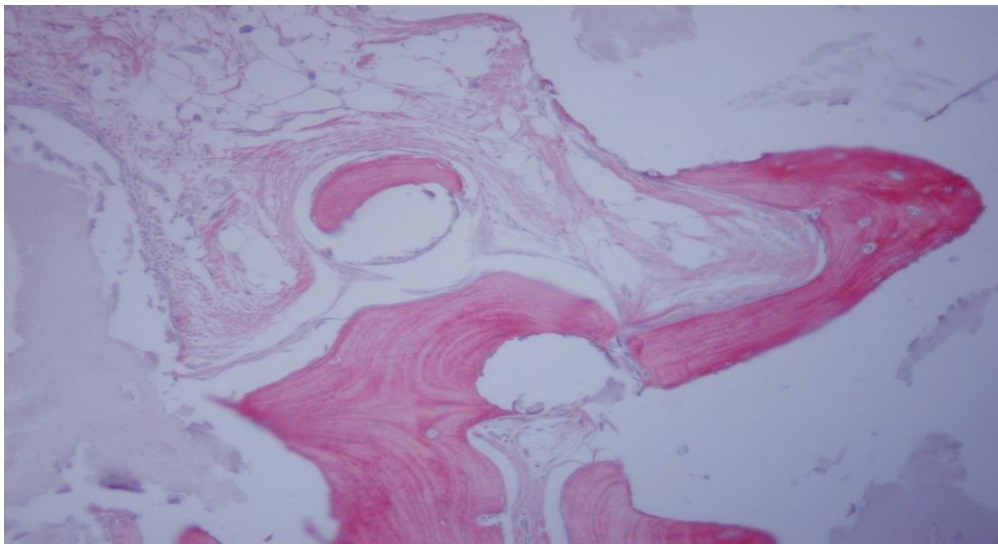


Figura 40. Estudio histológico a las 12 semanas del implante femoral con bloque de HA+MSCs capacitadas mediante el TRAP. Se observa el tejido óseo neoformado con matriz madura (rojo claro) flanqueada por evidentes líneas cementantes, así como láminas de osteoide (rojo intenso) con osteocitos atrapados. Tinción con TG. x200.

Tras el estudio histológico de todos los implantes rescatados, se evidencia, por un lado, con la tinción de HE, la gran cantidad de fibras de colágeno que se desarrollan de forma ordenada; y, por otro lado, con la tinción de TG (Figura 35), que marca de azul el tejido cartilaginoso, y de rojo el hueso neoformado, podemos afirmar que la adición de MSCs, capacitadas con rhTGF- β 1-F2, rhBMP-2, dex y β -GP en un cultivo celular 3D con gel de colágeno, posibilita la formación de hueso maduro infiltrado en los bloques de HA, con suficiente cantidad para soportar a su través las cargas mecánicas en este modelo de resección segmentaria ósea femoral, estabilizada con una placa de osteosíntesis de 1.2 mm, dado que no se ha producido rotura de placas.

4.4 Estadística

Plan estadístico:

Se realizó análisis descriptivo mediante distribución de frecuencias. Se compararon los grupos (I vs II, I vs III, I vs IV) según variables de formación de hueso, consolidación y tipo de consolidación, mediante el estadístico de Fisher, y estableciendo el nivel de significación estadística en $p < 0,05$.

ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA - 4 GRUPOS

Estadísticos

Grupo

N	Válidos	32
	Perdidos	0

Grupo

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Aloinjerto	8	25,0	25,0	25,0
	Hidroxiapatita	8	25,0	25,0	50,0
	Hidroxiapatita + Cultivo primario	8	25,0	25,0	75,0
	Hidroxiapatita+cultivo en trap	8	25,0	25,0	100,0
	Total	32	100,0	100,0	

Tablas de contingencia

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Grupo * Formación hueso	32	100,0%	0	,0%	32	100,0%
Grupo * Consolidación	32	100,0%	0	,0%	32	100,0%
Grupo * Tipo consolidación	16	50,0%	16	50,0%	32	100,0%

Tabla de contingencia Grupo * Formación hueso

			Formación hueso		Total
			No	Si	
Grupo	Aloinjerto	Recuento	0	8	8
		% de Grupo	,0%	100,0%	100,0%
	Hidroxiapatita	Recuento	8	0	8
		% de Grupo	100,0%	,0%	100,0%
	Hidroxiapatita + Cultivo primario	Recuento	0	8	8
		% de Grupo	,0%	100,0%	100,0%
	Hidroxiapatita+cultivo en trap	Recuento	0	8	8
		% de Grupo	,0%	100,0%	100,0%
Total		Recuento	8	24	32
		% de Grupo	25,0%	75,0%	100,0%

Tabla de contingencia Grupo * Consolidación

			Consolidación		Total
			No	Si	
Grupo	Aloinjerto	Recuento	0	8	8
		% de Grupo	,0%	100,0%	100,0%
	Hidroxiapatita	Recuento	8	0	8
		% de Grupo	100,0%	,0%	100,0%
	Hidroxiapatita + Cultivo primario	Recuento	8	0	8
		% de Grupo	100,0%	,0%	100,0%
	Hidroxiapatita+cultivo en trap	Recuento	0	8	8
		% de Grupo	,0%	100,0%	100,0%
Total		Recuento	16	16	32
		% de Grupo	50,0%	50,0%	100,0%

Tabla de contingencia Grupo * Tipo consolidación

			Tipo consolidación		
			Parcial	Total	
Grupo	Aloinjerto	Recuento	0	8	8
		% de Grupo	,0%	100,0%	100,0%
	Hidroxiapatita+cultivo en trap	Recuento	8	0	8
		% de Grupo	100,0%	,0%	100,0%
Total		Recuento	8	8	16
		% de Grupo	50,0%	50,0%	100,0%

COMPARACIÓN GRUPO I VS GRUPO II

Tablas de contingencia

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Grupo * Formación hueso	16	100,0%	0	,0%	16	100,0%
Grupo * Consolidación	16	100,0%	0	,0%	16	100,0%
Grupo * Tipo consolidación	8	50,0%	8	50,0%	16	100,0%

Grupo * Formación hueso

Tabla de contingencia

			Formación hueso		
			No	Si	Total
Grupo	Aloinjerto	Recuento	0	8	8
		% de Grupo	,0%	100,0%	100,0%
	Hidroxiapatit a	Recuento	8	0	8
		% de Grupo	100,0%	,0%	100,0%
Total		Recuento	8	8	16
		% de Grupo	50,0%	50,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	16,000(b)	1	,000		
Corrección por continuidad(a)	12,250	1	,000		
Razón de verosimilitudes	22,181	1	,000		
Estadístico exacto de Fisher				<0,001	,000

Asociación lineal por lineal	15,000	1	,000		
N de casos válidos	16				

a Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b 4 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 4,00.

Nota: Existen diferencias en la formación de hueso entre grupo I vs II

Grupo * Consolidación

Tabla de contingencia

			Consolidación		Total
			No	Si	
Grupo	Aloinjerto	Recuento	0	8	8
		% de Grupo	,0%	100,0%	100,0%
	Hidroxiapatit a	Recuento	8	0	8
		% de Grupo	100,0%	,0%	100,0%
Total		Recuento	8	8	16
		% de Grupo	50,0%	50,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	16,000 ^(b)	1	,000		
Corrección por continuidad(a)	12,250	1	,000		
Razón de verosimilitudes	22,181	1	,000		
Estadístico exacto de Fisher				<0,001	,000
Asociación lineal por lineal	15,000	1	,000		
N de casos válidos	16				

a Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b 4 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 4,00.

Nota: Existen diferencias en la consolidación de hueso entre grupo I vs II

Grupo * Tipo consolidación

Tabla de contingencia

			Tipo consolidación	Total
			Total	
Grupo	Aloinjerto	Recuento	8	8
		% de Grupo	100,0%	100,0%
Total		Recuento	8	8
		% de Grupo	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor
Chi-cuadrado de Pearson	.(a)
Corrección por continuidad	
Razón de verosimilitudes	
Asociación lineal por lineal	
N de casos válidos	8

a No se calculará ningún estadístico porque Grupo y Tipo consolidación son constantes.

COMPARACIÓN GRUPO I VS GRUPO III

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Grupo * Formación hueso	16	100,0%	0	,0%	16	100,0%
Grupo * Consolidación	16	100,0%	0	,0%	16	100,0%
Grupo * Tipo consolidación	8	50,0%	8	50,0%	16	100,0%

Grupo * Formación hueso

Tabla de contingencia

			Formación hueso	
			Si	Total
Grupo	Aloinjerto	Recuento	8	8
		% de Grupo	100,0%	100,0%
	Hidroxiapatita + Cultivo primario	Recuento	8	8
		% de Grupo	100,0%	100,0%
Total		Recuento	16	16
		% de Grupo	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor
Chi-cuadrado de Pearson	.(a)
Corrección por continuidad	
Razón de verosimilitudes	
Asociación lineal por lineal	
N de casos válidos	16

a No se calculará ningún estadístico porque Formación hueso es una constante.

Grupo * Consolidación

Tabla de contingencia

			Consolidación		Total
			No	Si	
Grupo	Aloinjerto	Recuento	0	8	8
		% de Grupo	,0%	100,0%	100,0%
	Hidroxiapatita + Cultivo primario	Recuento	8	0	8
		% de Grupo	100,0%	,0%	100,0%
Total		Recuento	8	8	16
		% de Grupo	50,0%	50,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	16,000 ^(b)	1	,000		
Corrección por continuidad ^(a)	12,250	1	,000		
Razón de verosimilitudes	22,181	1	,000		
Estadístico exacto de Fisher				<0,001	,000
Asociación lineal por lineal	15,000	1	,000		
N de casos válidos	16				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 4 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 4,00.

Nota: Existen diferencias en la consolidación del hueso entre el grupo I y el grupo III

Grupo * Tipo consolidación

Tabla de contingencia

			Tipo consolidación	
			Total	Total
Grupo	Aloinjerto	Recuento	8	8
		% de Grupo	100,0%	100,0%
Total		Recuento	8	8
		% de Grupo	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor
Chi-cuadrado de Pearson	.(a)
Corrección por continuidad	
Razón de verosimilitudes	
Asociación lineal por lineal	
N de casos válidos	8

a No se calculará ningún estadístico porque Grupo y Tipo consolidación son constantes.

COMPARACIÓN GRUPO I VS GRUPO IV

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Grupo * Formación hueso	16	100,0%	0	,0%	16	100,0%
Grupo * Consolidación	16	100,0%	0	,0%	16	100,0%
Grupo * Tipo consolidación	16	100,0%	0	,0%	16	100,0%

Grupo * Formación hueso

Tabla de contingencia

			Formación hueso	
			Si	
Grupo	Aloinjerto	Recuento	8	8
		% de Grupo	100,0%	100,0%
	Hidroxiapatita+cultivo en trap	Recuento	8	8
		% de Grupo	100,0%	100,0%
Total		Recuento	16	16
		% de Grupo	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor
Chi-cuadrado de Pearson	.(a)
Corrección por continuidad	
Razón de verosimilitudes	
Asociación lineal por lineal	
N de casos válidos	16

a No se calculará ningún estadístico porque Formación hueso es una constante.

Grupo * Consolidación

Tabla de contingencia

			Consolidación	
			Si	Total
Grupo	Aloinjerto	Recuento	8	8
		% de Grupo	100,0%	100,0%
	Hidroxiapatita+cultivo en trap	Recuento	8	8
		% de Grupo	100,0%	100,0%
Total		Recuento	16	16
		% de Grupo	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor
Chi-cuadrado de Pearson	.(a)
Corrección por continuidad	
Razón de verosimilitudes	
Asociación lineal por lineal	
N de casos válidos	16

a No se calculará ningún estadístico porque Consolidación es una constante.

Grupo * Tipo consolidación

Tabla de contingencia

			Tpo consolidación		
			Parcial	Total	
Grupo	Aloinjerto	Recuento	0	8	8
		% de Grupo	,0%	100,0%	100,0%
	Hidroxiapatita+cultivo en trap	Recuento	8	0	8
		% de Grupo	100,0%	,0%	100,0%
Total		Recuento	8	8	16

	% de Grupo	50,0%	50,0%	100,0%
--	------------	-------	-------	--------

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	16,000 ^(b)	1	,000		
Corrección por continuidad ^(a)	12,250	1	,000		
Razón de verosimilitudes	22,181	1	,000		
Estadístico exacto de Fisher				<0,001	,000
Asociación lineal por lineal	15,000	1	,000		
N de casos válidos	16				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 4 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 4,00.

Nota: Existen diferencias significativas entre el grupo I vs IV según el tipo de consolidación

Capítulo V

5. DISCUSIÓN

En nuestra práctica clínica diaria en un Servicio de Traumatología el autoinjerto óseo es imprescindible, por distintas patologías como pseudoartrosis, revisiones de cadera y rodillas, patología tumoral, déficit óseos en fracturas abiertas de huesos largos. En la literatura se publican diariamente sus resultados y siguen siendo el *gold standard* en la actualidad.

La incorporación de los injertos es un proceso largo, que incluye diferentes etapas complejas de interacción con el huésped. Los autoinjertos generalmente se integran de forma completa y más rápidamente que los aloinjertos. Sin embargo, debido a que la cantidad de autoinjertos es limitada y que su extracción conlleva morbilidad, los aloinjertos son cada vez más utilizados.

Los aloinjertos pueden pasar por periodos muy prolongados de remodelación activa, dependiendo de su porosidad, hasta lograr una incorporación definitiva al huésped. Por esta razón, la función que se espera que desempeñen indica la clase de injerto que se debe utilizar (Einhorn y cols., 1998).

La actividad biológica de los injertos en los sitios a donde son trasplantados incluye al menos dos procesos: osteoinducción y osteoconducción.

La osteoinducción se refiere al potencial de los injertos de estimular la formación de hueso nuevo. Esto se produce gracias a la presencia de proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) presentes en las células, pero sobre todo en las matrices de los injertos. Los autoinjertos tienen un potencial muy grande de estímulo, pues muchas de sus células se mantienen vivas en el proceso del trasplante. Los aloinjertos, por supuesto tienen un potencial menor, pues no tienen células vivas, sin embargo,

proteínas como las BMPs permanecen en el injerto y conservan una capacidad leve de inducción (Friedlaender y cols., 1987).

La osteoconducción es una característica que tienen todos los injertos. Se presenta gracias a que los injertos proporcionan una matriz tridimensional que es invadida por capilares del huésped, tejido perivascular y células osteoprogenitoras. El mejor sustitutivo óseo es el hueso mismo, ya sea proveniente del propio paciente, como en el caso del autoinjerto óseo, o bien obtenido de un donante, como cuando se emplea un aloinjerto óseo (Albrektsson y cols., 2001).

Como quiera que fuere, los eventos biológicos que ocurren entre el injerto y el huésped son:

1. Formación de hematoma con liberación de citoquinas y factores de crecimiento.
2. Inflamación, migración y proliferación de células mesenquimales y crecimiento de tejido fibrovascular alrededor del injerto.
3. Invasión de vasos capilares dentro del injerto, frecuentemente utilizando los ya existentes canales haversianos o de Volkman.
4. Reabsorción osteoclástica focal de las superficies del injerto.
5. Osificación intramembranosa o endondral en las superficies del injerto.

De los factores mencionados anteriormente la reacción inflamatoria en el sitio de implantación es la más importante. Como en cualquier respuesta inflamatoria reparadora, las plaquetas se adhieren rápidamente a las superficies de la herida, se degranulan y liberan amplia variedad de factores de crecimiento incluyendo, como las BMPs FGF-2, PDGF, ó TGF- β , dentro de la malla de fibrina formada por la coagulación de la sangre y el líquido extracelular. De igual manera neutrófilos, linfocitos y monocitos

son atraídos al sitio inflamado y migran dentro del hematoma organizado. Los neutrófilos particularmente liberan quininas y prostaglandinas que son angiogénicas de manera que el tejido de granulación resultante está compuesto de pequeños capilares y tejido fibroso edematoso rico en citoquinas y factores de crecimiento (Finkemeier 2002).

Las condiciones mecánicas que rodean al injerto también tienen un efecto profundo en la vascularización y diferenciación celular, de tal manera que si el injerto no logra una estabilidad mecánica adecuada, es probable que se desarrolle tejido de granulación y fibrosis en la interfase entre el injerto y el receptor.

Más de 200.000 casos de aloinjertos se usan cada año en los EE.UU (Khan y cols., 2005). La falta de morbilidad del sitio donante, el éxito general de los resultados y la disminución de los tiempos quirúrgicos hacen del aloinjerto una alternativa atractiva al autoinjerto. Sin embargo, los altos costos y riesgos tales como la transmisión viral hacen del aloinjerto un sustituto imperfecto. El riesgo de transmisión viral asociada es para la hepatitis B una entre 63.000 pacientes, para la hepatitis C es una entre 100.000 y para el VIH es menos de uno entre un millón (Laurencin., 2003).

En este estudio Lamberton y cols., en 2011 publica sus resultados sobre revisión de caderas con uso del aloinjerto, entre 1987 y 1999, se operan 540 casos de revisión de artroplastias totales de cadera en 487 pacientes, se realizan mediante impactación femoral del injerto con un vástago femoral cementado. Todos los pacientes fueron seguidos prospectivamente durante 2 a 15 años después de la operación sin pérdidas en el seguimiento. Un total de 494 caderas se mantuvo con éxito in situ a un promedio de 6,7 años. La tasa de supervivencia a 10 años fue del 98,0% (intervalo de confianza del 95%, 96,2-99,8) con aflojamiento aséptico como el punto

final y el 84,2% (intervalo de confianza del 95%, 78,5-89,9) de reoperación por cualquier otra razón.

De Paolis y cols., 2013, escribe como entre 1999 y 2012, 45 pacientes fueron sometidos a resecciones pélvicas para tumores óseos periacetabulares seguido de la reconstrucción con prótesis de copa del vástago, en 33 casos, este implante se asoció con aloinjerto óseo masivo, con prótesis de vástago ilíaca compuesto: vástago de la prótesis copa combinado con aloinjerto. El seguimiento mínimo requerido para evaluar el resultado funcional fue de 2 años. La osteotomía iliaca se fusionó en todos los casos a los 10 meses de la cirugía, con un caso de pseudoartrosis frecuente del anillo pélvico anterior que no ha afectado a la estabilidad del implante.

En 2015 Beckmann y cols., realiza una revisión sistemática del uso del aloinjertos óseos en pacientes operados de artroplastia total de rodilla de revisión. Hubo un total de 551 aloinjertos utilizados en 476 artroplastias de revisión descritos en 17 artículos. En 75 de estas artroplastias, los aloinjertos fueron colocados en ambos fémures y tibias; en 195 artroplastias, se colocaron sólo en la tibia y en 132 sólo en el fémur. En 74 casos no se ha especificado la ubicación del aloinjerto. El período de seguimiento medio fue de 70,8 meses (5,9 años). La edad media de estos pacientes en el momento de la cirugía de revisión fue 67,9 años. En estos pacientes la tasa de fracaso del aloinjerto que obligaron a la reintervención por aflojamiento o fractura del injerto fue del 6,5%; la reoperación, debido al aflojamiento de la prótesis fue del 3,4% y debido a la infección fue de 5,5%. En conjunto una tasa baja de complicaciones con un buen comportamiento del aloinjerto.

Proponemos la terapia celular como alternativa a la utilización de aloinjertos, uno de los problemas que presenta la utilización experimental y

clínica de la terapia celular autóloga, es la necesidad de disponer de un transportador adecuado para las células.

Entre los materiales de mayor interés para reconstruir defectos óseos se encuentran los biomateriales cerámicos, debido a sus reconocidas propiedades osteoconductiva, biocompatibilidad, capacidad de biodegradación, disponibilidad cuantitativa ilimitada, y condiciones apropiadas para ser empleados como moldes para la ingeniería de tejidos. A este grupo pertenece la hidroxiapatita (HA) coralina (Roy y cols., 1974).

La HA coralina es un biomaterial poroso que se obtiene a partir de corales marinos, en los que por un proceso de intercambio hidrotermal, el carbonato cálcico de sus esqueletos es transformado en fosfato de calcio. Para su empleo clínico se dispone de una presentación que se obtiene de especies del género *Porites porites*, que tiene un tamaño de poros entre 190 y 230 μm y que ofrece un diseño adecuado para matrices de reconstrucción del hueso cortical y otra que se consigue de la duplicación de *Porites goniopora* que presenta poros de 500 μm y que se reserva para la sustitución del hueso esponjoso. La HA coralina es una de las cerámicas de fosfato de calcio menos solubles y se reabsorbe lentamente. Se presenta preformada en gránulos o bloques, por lo que puede tener dificultades de adaptación a los defectos óseos. En este trabajo, dado nuestro modelo biomecánico, necesitamos un transportador rígido para rellenar el defecto óseo de 5mm.

La HA se ha probado con eficacia en un modelo subcutáneo en ratas (Ohgushi y cols., 1999). Las células de médula ósea (MO) se recogen de fémur de rata y se cultivan en medio esencial mínimo suplementado con FBS al 15%. Los discos de HA se impregnan en la suspensión de células y se cultivan adicionalmente en el mismo medio con β -glicerofosfato (β -GP), ácido ascórbico (AA) y dexametasona (dex) durante 14 días y

posteriormente se implantan. A las ocho semanas todos los discos de HA muestran formación de hueso en el interior de las áreas de los poros, como demuestran los cortes histológicos descalcificados y la microtomografía. La combinación de células mesenquimales (MSCs) e HA podría ser utilizado como un excelente sustituto de injerto óseo debido a sus propiedades mecánicas y la capacidad de formación de hueso (Nishikawa y cols., 2004).

Glatt y cols., en 2012, describen un modelo murino de resección segmentaria del fémur, usan como transportador una esponja de colágeno para ocupar el defecto con el implante de 11 gr de rhBMP-2, se estabiliza la resección ósea con una osteosíntesis con fijación externa con distintos grados de rigidez, baja, media y gran rigidez del montaje. El grupo control consiste en esponja de colágeno sin de rhBMP-2. Donde más hueso se produce es en el grupo de la fijación externa de baja rigidez con rhBMP-2.

Liu y cols., 2013, usan como transportador un *composite* de nanohidroxiapatita, colágeno y sulfato cálcico. Se implanta el constructo junto con rhBMP-2 en un defecto crítico en el cóndilo femoral de un conejo. Los resultados radiológicos y tinciones histológicas indican que se produce más hueso nuevo en el grupo del rhBMP-2. Los resultados sugieren ser un modelo prometedor para la formación y reparación hueso en la Ingeniería de Tejidos.

En nuestro estudio se usa un modelo de resección segmentaria en fémur de rata, con un defecto de 5 mm, que se ha demostrado ser un defecto crítico y no consolida espontáneamente (Mehta y cols., 2011). Se describen múltiples modelos de resección segmentaria para implantar células como factores de crecimiento.

Warzecha y cols, 2013 utiliza el mismo modelo de resección segmentaria en fémur con placa de osteosíntesis de 1.0 mm, en este caso de otro fabricante Synthes con tornillos de 1.3 mm para el estudio de la osificación, utiliza como andamiaje el trifosfato cálcico y como osteoinductor la BMP 2, obtiene un buen modelo biomecánico para el estudio.

Se describen varios métodos de fijación para estabilizar un defecto óseo en el fémur de la rata, son métodos que se usan habitualmente en la práctica clínica de la traumatología en el tratamiento de la fracturas de los pacientes, como las placa de osteosíntesis, enclavamiento endomedulares y fijación externa. La fijación endomedular con agujas carece de mecanismo de bloqueo para evitar el movimiento interfragmentario que provoca la reducción o disminución de la longitud del defecto óseo. La fijación con placa de osteosíntesis si mantiene la estabilidad y la longitud del defecto durante todo el seguimiento de las ratas, sin embargo no se fabrican placas para estudios experimentales en ratas específicamente, y hay que usarlas de las que implantamos en la práctica clínica habitual traumatológica. Además para el uso de placa de osteosíntesis se precisa un entrenamiento previo importante por la dificultad de su manejo.

Cabe destacar que tanto las placas como las agujas están en contacto con las células, factores o transportadores que usan y pueden interferir en las características fisiológicas del medio.

El uso de fijación externa evita el contacto entre los materiales de fijación y los tejidos locales dentro de los defectos, evitando así las células implantadas de la posible exposición a estímulos no fisiológicas. La aplicación de un fijador externo también es relativamente fácil y no requiere una formación especializada.

Se han desarrollado varios sistemas de fijación externa para el tratamiento de defectos óseos en ratas. Por razones prácticas, el fijador externo debe ser ligero, barato y relativamente fácil de aplicar, y estable a través de la duración del experimento.

Las complicaciones más comunes de la fijación externa son el aflojamiento y la infección del pin (Moroni I y col., 2002), en este trabajo refleja nueve casos de infecciones de los pines y nueve aflojamientos de los pines, se corrigieron con cremas antibióticas y apretando nuevamente los pines respectivamente.

La decisión de estabilizar el defecto óseo con una placa de osteosíntesis en vez de una fijación externa, es por presentar mayor estabilidad y ser más confortables para las ratas (Drosse y cols., 2008, Jäger y cols., 2008).

Con este modelo podemos ocupar el defecto óseo de 5 mm con el bloque de HA con o sin células.

En este estudio, el grupo I con 8 ratas que presentan un defecto en fémur de 5 mm, se estabilizan con una placa de osteosíntesis de 1.5 mm, ocupando el defecto con un aloinjerto de 5 mm de fémur de otra rata singénica. Radiológicamente se observa una buena osteointegración, y no se observa ningún fracaso biomecánico a las doce semanas, no se observa roturas de placas de osteosíntesis. Histológicamente todas las muestras se comportan como un aloinjerto óseo, se observa nítidamente las líneas cementantes en tinción de HE entre el aloinjerto y el hueso receptor. Las lagunas osteocíticas del hueso implantado se encuentran vacías. Con tinción de PS tiene afinidad por el colágeno I, que es el más abundante en el hueso. Hay abundantes frentes de remodelación ósea, lo que da una idea de la alta actividad celular de la zona. Con la tinción tricrómico de Goldner (TG) observamos el hueso receptor más

cartílago hialino. Esta tinción distingue hueso neoformado de color rojo, del hueso normal, azul, y es negativo para cartílago. Todas las muestras de todos los casos se han mostrado igual histológicamente. En la estadística descriptiva hemos tenido un 100% de consolidación y un 100% de no rotura de paca de osteosíntesis. Con un test de Fisher de 0.002, hay diferencias significativas entre los grupos I y II en relación a la consolidación.

El grupo II con 8 ratas, con un defecto en fémur de 5 mm se estabilizan con una placa de osteosíntesis de 1.5 mm, se rellena el espacio con un bloque de hidroxiapatita de 5 mm sin células. A las 12 semanas se produce un fracaso biomecánico en todos los casos, con rotura de todas las placas de osteosíntesis, histológicamente se muestra con un tejido fibrótico en todas las muestras, se produce una pseudoartrosis y se comporta como tal histológicamente. Ferreira y cols., en 2012, publican en modelo de resección segmentaria en fémur, los ratones no tratados con células, todos quedaron en pseudoartrosis con un aspecto característico de tejido fibroso, los ratones tratados con terapia celular, en diferentes grados se obtuvo tejido osteoide en los todos estos grupos.

La ingeniería tisular abre un campo de investigación para crear tejido óseo, para su posterior aplicación a la cirugía ortopédica, en la que está tan demandado el autoinjerto y aloinjerto óseo. Se han desarrollado polímeros sintéticos y naturales que evitan los riesgos de los aloinjertos y autoinjertos, pero carecen de la mayoría de las propiedades osteoinductivas o osteogénicas del hueso (Logeart-Avramoglou y cols., 2005).

Otro enfoque es el uso de las BMPs, que son capaces de inducir la osteogénesis por las células progenitoras residentes, pero que se han asociado con la formación de hueso aberrante, neurotoxicidad, desarrollo

del cáncer, altos costos y una vida media de la proteína corta, lo que hace su aplicación local poco recomendable. (Deutsch, 2010, Carragee y cols., 201, Calori y cols., 2009).

La ingeniería de tejidos se ha convertido en una alternativa atractiva, para mejorar los resultados de las técnicas actuales. Se basa en células osteoprogenitoras autólogas derivadas de la médula ósea (células estromales mesenquimales, MSCs) expandidas en placas de plástico y combinadas con un transportador osteoconductor con el fin de generar tejido óseo.

MSCs se han aislado y caracterizado a partir de muestras de médula ósea de muchas especies incluyendo el ser humano, conejo, rata, oveja, cabra, mono, perro y cerdo a través de su unión preferencial a las superficies plásticas del cultivo celular (Lennon y cols., 2006).

Friedenstein y cols., en 1970 establecieron las normas de cultivo de MSCs del cobaya en virtud de MSCs por unirse a matrices de plástico, y el método original se ha utilizado para otros cultivos de MSCs procedentes de MO de diferentes animales incluidos los humanos. Este método ha demostrado ser ineficiente para célula madre mesenquimática murina (mMSC) debido al bajo número de mMSCs y la abundante presencia de las células hematopoyéticas en los cultivos. Para resolver este problema, muchos grupos han desarrollado diversas condiciones de cultivo.

Kopen y cols., en 1999 desarrollaron un método para eliminar las células mielopoyéticas utilizando un anticuerpo anti-CD11b, pero este protocolo no podría agotar todas las células hematopoyéticas.

Baddoo y cols., en 2003 publicaron un enfoque de purificación modificado basado en la disminución de células de médula ósea cultivadas con marcadores CD11b / CD34 / CD45 positivos.

También se describen otras técnicas, incluyendo la optimización de la densidad del cultivo y el cambio frecuente del medio del cultivo (Soleimani y cols., 2009).

Xu y cols., en 2010 publican su metodología para el aislamiento, expansión y crecimiento a partir de MSC. Se obtienen fémures, tibias y vértebras de la rata, que se disecan y limpian cuidadosamente de los tejidos adheridos. Después se cortan las puntas de cada hueso y la BM es recogida por el lavado de los contenidos de fémur y la tibia con RPMI 1640 (Lonza, Verviers, Bélgica), se cortan en trozos más finos de 1-2mm el fémur, la tibia y vértebras con un bisturí y aplastándolos suavemente. Se trataron enzimáticamente los huesos con colagenasa. En este estudio, usando el método de aislamiento modificado, se pudo aislar 19,4% más de células nucleadas-BM que el método estándar. Tras obtener la médula, con varios pases, se van reduciendo las células monocíticas, las hematopoyéticas hasta obtener MSC puras.

En el presente trabajo, las células de MO, se someten a un período de cultivo de 10 días a muy baja concentración de suero (período de selección, PS) con el propósito de eliminar la mayor parte de las células de la línea hematopoyética. La presencia del rhTGF- β 1-F2, permitirá mantener vivas de manera selectiva la población de células madre osteoprogenitoras que pretendemos seleccionar. El medio de cultivo se renueva cada 3-4 días añadiendo factor fresco.

La caracterización fenotípica de las células del cultivo celular adherente o primario se consigue por citometría de flujo constatando que las células están en fase activa G0/G1 y como marcadores fenotípicos son positivos CD 29, CD 73, CD 105, CD 166, HLA I, STRO-1 y negativos para CD 34, CD 45 y CD 44. Es constante en todos los cultivos primarios.

La caracterización de las células capacitadas en cultivo 3D o TRAP, en un primer momento la maduración es más lenta a los 10 días, se observan marcadores de células de células mesenquimáticas, endoteliales y hematopoyéticas, a los 16 días se identifican CD 29, CD 105, STRO-1, CD 271 y se negativizan los marcadores endoteliales CD 34 y CD133, y los hematopoyético CD45, también se produce una disminución CD 166 como molécula de adhesión.

La TGF- β y sus factores relacionados, incluyendo ϵ BMPs y activinas, regulan diversos procesos celulares, tales como la proliferación, la diferenciación, la apoptosis y la formación de matriz extracelular durante la embriogénesis. La señalización de TGF- β está mediada por dos tipos de receptores transmembrana serina / treonina quinasa, de tipo I (ALK5) y los receptores de tipo II, que forman un complejo heteromérico. En este complejo de señalización, el TGF- β se une al receptor de tipo II (TGF β R2), fosforilando el de tipo II fosforilan y activan al receptor ALK5. El ALK5 activado induce las cascadas de señalización a través de vías Smad-dependientes y Smad-independientes. En la vía Smad-dependiente, el complejo de TGF- β -receptor activa Smad 2 /3, mientras que el complejo de BMP-receptor activa Smad 1/5/8 (Matsunobu y cols., 2009).

Chen y cols, en 2012 describen en una revisión la importancia de las TGF- β) / BMP en la señalización de una gran cantidad de procesos celulares y es importante durante toda la vida. Las TGF- β / BMP actúa en la formación del hueso en los mamíferos. La transducción de señales por las TGF- β / BMP se realiza específicamente a través una vía Smad dependiente (TGF- β / BMP ligandos, receptores y Smads) y otra Smad-independiente (vía activada por mitógenos proteína quinasa p38, MAPK).

En nuestro trabajo usamos una rhTGF- β 1-F2, la particularidad de la molécula F2, es por la afinidad a unirse al colágeno, por lo que se

intensifica su acción en el medio. La secuencia de ADNc que codifica la región carboxi-terminal de la rhTGF- β 1 se ha diseñado para incluir un decapeptido de alta afinidad de unión a colágeno derivado del factor de von Willebrand. (Andrades y cols., 1999).

Las BMPs han demostrado en estudios en animales y en humanos su capacidad para la osteoinducción. En nuestro modelo usamos la rhBMP-2 (Gothard y cols., 2014).

Las BMPs se identificaron originalmente por Urist en 1965, como componentes orgánicos que se encuentran en la matriz ósea que podría inducir la formación de hueso ectópico. De estas, la BMP-2 es una de las citoquinas osteoinductoras más potentes que han demostrado la formación de hueso y cartílago en varios modelos animales. Cuando los cultivos de MSCs se tratan con BMP-2, estas células se comprometen con el linaje osteogénico o condrogénica y, dependiendo de las condiciones de cultivo, maduran como condrocitos u osteoblastos. Además, se ha publicado que el TGF- β 1 en combinación con BMP-2 aumenta fuertemente la formación de hueso ectópico, y el volumen de hueso resultante es cinco veces mayor que la inducida por BMP-2 sola. (Andrades y cols. 2003).

Tachi y cols., 2011 publican los resultados de la actividad osteoinductora de la BMP-2, usando esponjas de colágeno que contienen 5 gr de BMP que se implantan en los tejidos musculares del ratón, los implantes crecen hasta el día 7, posteriormente aparece la calcificación sobre el día 14. La adición de 50 ng de TGF- β 1 a la BMP-2 que contienen las esponjas de colágeno, acelera marcadamente el crecimiento de las masas, aumentando cinco veces el volumen total en comparación la BMP-2 sola. Y el número de osteoblastos se duplica en el hueso ectópico a los 14 días, mientras que el número de osteoclastos se reduce a la mitad. En el mismo trabajo se usa la esponja de colágeno

para ocupar el defecto creado quirúrgicamente en el cráneo de la rata. Un grupo con colágeno más TGF- β 1 y otro con BMP-2 más TGF- β 1, en el primer grupo hubo una ocupación parcial de hueso del defecto, mientras que en el grupo hubo una ocupación completa del defecto óseo craneal. Estos resultados sugieren que el TGF- β 1 más la BMP-2 aceleran el crecimiento y la formación de tejido óseo y regulan la generación de osteoblastos y osteoclastos.

La gran mayoría de estudios *in vitro* en el campo de la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos, se llevan a cabo en estructuras de 2 dimensiones. Los investigadores han expresado la necesidad de desarrollar sistemas de cultivo que mejor representan el entorno natural de las células en los tejidos y órganos. El grupo de la UMA ha desarrollado con éxito un sistema de cultivo en gel de colágeno en 3D, que permite estudiar el aislamiento, la expansión y el crecimiento de las células derivadas de médula ósea y evaluar la capacidad de estas células para diferenciarse en hueso y / o tejido cartilaginoso cuando se implantan *in vivo* (Andrades y cols., 1999, 2002, 2003), (Becerra y cols., 2006), (Claros y cols., 2012).

En el presente estudio hemos tratado de caracterizar adicionalmente las células derivadas de MO, aislándolas en el sistema de cultivo de gel de colágeno 3D con la exposición a una nueva proteína de fusión TGF- β 1 recombinante humana (rhTGF- β 1-F2), diseñada por contener un dominio auxiliar de unión al colágeno. Y la combinación de rhTGF- β 1-F2 y rhBMP-2 ha mejorado la diferenciación de las MSC hacia el linaje osteogénico, y el cultivo completo o TRAP, teniendo en cuenta que en el cultivo primario no se añade pulsos de rhBMP-2.

También hay que tener en cuenta, el uso en la fase la inducción del cultivo, durante los 3 días últimos días, tanto en el cultivo primario como en el TRAP, de la adición dexametasona (10^{-8} M) y β -glicerolfosfato

(2mM), como osteoinductores inespecíficos. Pasado los 17 días las células se despegaron, contaron e implantaron en los grupos III y IV, respectivamente.

En las cámaras de matriz ósea mineralizada con las células capacitadas en el TRAP, tras cuatro semanas el estudio histológico muestra grandes placas de tejido similar al hueso trabecular muy vascularizado con numerosos osteoblastos con positividad al colágeno tipo I que confirma que se trata de tejido óseo. En las cámaras de difusión se forma tejido osteocartilaginoso en todas las muestras.

En el grupo III, con resección segmentaria de fémur estabilizada con placa de osteosíntesis de 1.5 mm. Ocupando el defecto óseo con un bloque de hidroxiapatita de 5mm, con 2.4 millones de células osteoinducidas en cultivo primario.

Y en el grupo IV, con 2.4 millones de células osteoinducidas en el Trap, es decir con la conjunción de la rhTGF- β 1-F2 y rhBMP-2.

El grupo III, con 8 ratas operadas, tuvo un comportamiento biológico satisfactorio con la formación de tejido óseo, intercalado con tejido fibroso en todas las muestras, en diferencia con el grupo II, que fueron todas con tejido fibroso. Histológicamente en todas las muestras aparece tejido osteoide. Sin embargo biomecánicamente fracasaron todas las osteosíntesis, no hubo suficiente hueso formado como para obtener una consolidación plena del defecto óseo, hubo respuesta biológica pero no suficiente. En el estudio estadístico descriptivo no hubo diferencias entre el grupo I y III respecto a la formación de hueso pero si hay diferencias con test de Fisher con 0.002, respecto a la consolidación.

Respecto al grupo IV, el bloque de hidroxiapatita con los 2.4 millones de células osteoinducidas en el Trap, se obtienen en las 8 ratas tanto

consolidación de los defectos con histología tanto con PS y TG la formación de hueso maduro. Radiográficamente a las 12 semanas no hay ninguna placa de osteosíntesis rota, con lo que biomecánicamente es un modelo estable e histológicamente se ha formado mayor cantidad de hueso. No hay diferencias significativas respecto el grupo I y IV con un test de Fisher de 0.002. En los dos obtenemos consolidación.

En conclusión, y en base a los resultados radiográficos y a las evaluaciones histológicas obtenidas, el tratamiento con células capacitadas *in vitro* mediante el procedimiento del TRAP mostró mejores resultados que el tratamiento con MSCs procedentes de cultivo adherente, tanto en la cantidad y calidad del tejido osteocondral neoformado, como en la prevención de fracturas de las placas de osteosíntesis que daban estabilidad al sistema, siendo, muy probablemente, este último hecho consecuencia directa del primero, es decir, de la consolidación biológica producida en el defecto femoral.

Por tanto, y de cara a proponer un protocolo de Ingeniería Tisular para abordar la regeneración de huesos largos fracturados, consideramos que la Terapia Celular, llevada a cabo en un sistema de cultivo tridimensional como el descrito, muestra potencial suficiente para ser equiparable, e incluso una alternativa útil posible, al propio auto/aloinjerto.

Capítulo VI

6. CONCLUSIONES

1ª. Las células madre mesenquimales, capacitadas *in vitro* en cultivos en 3D con geles de colágeno, expresan marcadores de diferenciación osteogénicos típicos.

2ª. Las células madre mesenquimales, capacitadas *in vitro* en cultivos en 3D con geles de colágeno, son capaces de formar un tejido osteoide trabecular en cámaras de matriz ósea desmineralizada, así como cartílago hialino, y hueso en diferentes grados de maduración, en cámaras de difusión.

3ª. El Grupo I, en el que el defecto óseo ha sido tratado con aloinjerto de rata singénica, se ha comportado histológicamente con una osteointegración típica de este tipo de implantes, con presencia de línea cementante. Biomecánicamente es estable porque no se ha roto ninguna placa de osteosíntesis.

4ª. El Grupo II, tratado con bloque de hidroxiapatita sin células, se ha comportado como una pseudoartrosis, con fracaso biomecánico por rotura de todas las placas de osteosíntesis.

5ª. El Grupo III, tratado con bloque de hidroxiapatita y células madre mesenquimales de cultivo primario, ha presentado formación de hueso pero no consolidación del defecto, con fracaso biomecánico por rotura de todas las placas de osteosíntesis.

6ª. El Grupo IV, tratado con bloque de hidroxiapatita y células osteoinducidas *in vitro* por capacitación con rhTGF- β 1-F2 y rhBMP-2, muestra que todos los individuos implantados han desarrollado consolidación, propiciada por la madurez del tejido osteocondral neoformado. Biomecánicamente los resultados son satisfactorios, con un modelo estable sin ninguna placa de osteosíntesis rota.

Capítulo VII

7. BIBLIOGRAFIA

Alsalamleh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(5):1522-32.

Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, et al. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC developmental biology*. 2007;7:11.

Andrades JA, Han B, Becerra J, Sorgente N, Hall FL, Nimni ME: A Recombinant Human TGF-beta1 Fusion Protein with Collagen-Binding Domain Promotes Migration, Growth, and Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Cells. *Exp Cell Res*.1999;250:485-498.

Andrades JA, Wu LT, Hall FL, Nimni ME, Becerra J. Engineering, expression, and renaturation of a collagen-targeted human bFGF fusion protein. *Growth Factors* .2001; 18:261-275.

Andrades JA, Santamaría JA, Wu LT, Hall FL, Nimni ME, Becerra J. Production of a recombinant human bFGF with a collagen-binding domain. *Protoplasma*. 2001; 218:95-103.

Andrades JA, Santamaría JA, Nimni ME, Becerra J. Selection, amplification and induction of a bone marrow cell population to the chondro-osteogenic lineage by rhOP-1. An in vitro and in vivo study. *Int J Dev Biol*.2001; 45:689-693.

Andrades JA, Becerra J. Bone morphogenetic proteins, collagen matrices and mesenchymal stem cells. En: *Advances In Skeletal Reconstruction Using Bone Morphogenetic Proteins* (Ed. TS Lindholm, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.). 2002 pp.. 35-52.

Andrades JA, Han B, Nimni ME, Ertl, D. C.; Simpkins, R. T.; Arrabal PM, Becerra J. A modified rhTGF-beta1 and rhBMP-2 are effective in initiating a chondro-osseous differentiation pathway in the bone marrow cells cultured in vitro. *Connect Tissue Res*.2003; 44: 188-197.

Aggarwal S., Pittinger M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogenic immune cell responses. 2005; *Blood* 105:1815-1822.

Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2004;8(3):301-16.

Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Experimental hematology*. 2000;28(6):707-15.

Bauer TW, Smith ST: Bioactive materials in orthopaedic surgery. Overview and regulatory considerations. *Clin Orthop* 2002;395: 11-22.

Becerra J., Andrades J.A., Ertl D.C., Sorgente N., Nimni M.E. Demineralized bone matrix mediates differentiation of bone marrow stromal cells in vitro: effect of age of cell donor. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1996; 11: 1703-1714.

Becerra J, Andrades JA, Santamaría JA, Cifuentes M, Guerado E. Regeneración ósea, terapia celular e ingeniería tisular. *Med Clin (Barc)*. 2001; 116: 23-34.

Becerra J, Andrades JA, Claros, S, Bertrand ML, Gonzalez C, Guerado E. Marrow Cells In Vitro Committed by a Novel TGF- β 1 for Bone Repair Cell Therapy. A Case Report. *J Bone Miner Res* 2006.

Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature*. 2001; 414:118-121.

Bianco P. Stem cells and bone: A historical perspective. *Bone*. 2015; Jan;70C:2-9.

Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC cell biology*. 2006;7:14.

Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;6:281–290

Bostrom MPG. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998; (Supl 355): 116-23.

Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, Missri AA, Tomin E, Weilan A et al. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic protein 2 and 4 in fracture healing. J Orthop Res. 1995; 13: 357-67.

Boyce BF, Yao Z, Xing L. Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2009; 19:171-180.

Burg KJL, Porter S, Kellam JF: Biomaterials developments for bone tissue engineering. Biomaterials. 2000; 21:2347-59.

Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. J Orthop Res 1998; 16: 155-162.

Caplan A.I. The mesengenic process. Clin Plast Surg. 1994; 21(3):429-435.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells and gene therapy. Clin. Orthop. 2000; (Suppl 379): 67-70.

Caplan A.I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. 2007 .J Cellular Physiology DOI 10.1002, 341-347.

Claros S., Rodríguez-Losada N., E. Cruz, Guerado E., J. Becerra, Andrades JA Caracterización de madre adultas / poblaciones de células progenitoras de la médula ósea en un sistema de cultivo de gel de colágeno tridimensional. Trasplante de células. 2012.

Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. Clin J Am Soc Nephrol.2008; Nov;3 Suppl 3:S131-9.

Chakraborty C, Shah KD, Cao WG, Hsu CH, Wen ZH, Lin CS. Potentialities of induced pluripotent stem (iPS) cells for treatment of diseases. Current molecular medicine. 2010;10(8):756-62.

Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000;97(7):3213-8.

Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C-W, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. Cell Stem Cell.

De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis and rheumatism*. 2001;44(8):1928-42.

Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;282(1):148-52.

Djouad F, Fritz V, Apparailly F, Louis-Pence P, Bony C, Sany J, et al. Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(5):1595-603.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315–317.

Douchis JS, Goomer RS, Harwood FL, Khatod M, Coutts RD, Amiel D. Chondrogenic phenotype of perichondrium-derived chondroprogenitor cells is influenced by transforming growth factor-beta 1. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 1997;15(6):803-7.

Drosse I, Volkmer E, Seitz S, Seitz H, Penzkofer R, Zahn K, Matis U, Mutschler W, Augat P, Schieker M. Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: a biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective. *Tissue Eng Part C Methods*. 2008;14:79–88.

Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. 2000; *Surv Ophthalmol* 44,415-425.

Einhorn TA. The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing. *Clin orthop* 1998; (Suppl 355): 7-21.

Forriol F, Esparza R. Ingeniería tisular: aplicación de las células troncales pluripotenciales en cirugía ortopédica y traumatología. *Trauma*. 2008; *Fund MAPFRE* 19(2): 88-101.

Fridenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblasts precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. 1976; Exp Hematol 4, 267-274.

Fridenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. 1987; Cell Tissue Kinet, 20, 263-272.

Giannoudis, PV. Fracture healing and bone regeneration: autologous bone grafting or BMPs? Injury. 2009; 40(12): 1243-1244.

Guerado E., Barón M., Ruiz Arranz, Garcés G.: Tratamiento con placa AO de las fracturas diafisarias de antebrazo en el adulto. Rev Ortop Traum. 1991; 35-IB:471-474.

Guerado E, Díaz A, Arrabal MP, Cifuentes M, Andrades JA, Becerra J. Células madre e ingeniería tisular ósea: bases celulares y perspectivas terapéuticas. Rev Ortop Traumatol. 2003; 47, 362-374.

Guerado E, de la Varga Salto E, Diaz Martín A, García Herrera G, Perea-Milla E: Resultados del nuevo vástago femoral no cementado Meridian. Rev Ortop Traum. 2002; 46, 499 – 504.

Guerado E, Aguiar F, Perea-Milla E: An assessment of Cost-effectiveness Studies in Joint Replacement. Editorial. Int Orthop (SICOT). 2002; 26:63-65.

Guerado E, Andrist T, J.A. Andrades JA, Santos L, Cerván A, Guerado G, Becerra J.. Rev Esp Cir Ortop Traumatol. 2012;56:227-44.

Guerado, E. and C. H. Fuerstenberg). "What bone graft substitutes should we use in post-traumatic spinal fusion?" Injury. 2011; 42 Suppl 2: S64-71.

Gordon E.M., Skotzko M., Kundu R.K., Han B., Andrades J.A., Nimni M.E., Anderson W.F., Hall F.L. Capture and expansion of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with a transforming growth factor- β 1-von Willebrand's factor fusion protein for retrovirus-mediated delivery of coagulation factor IX. Human Gene Therapy. 1997; 8:1385-1394.

Gothard D, Smith EL, Kanczler JM, Rashidi H, Qutachi O, Henstock J, Rotherham M, El Haj A, Shakesheff KM, Oreffo RO. Tissue engineered bone using select growth factors: A comprehensive review of animal

studies and clinical translation studies in man. *Eur Cell Mater.* 2014 Oct 6;28:166-207.

Greenspan DC: Bioactive ceramic implant materials. *Science* 1999; 4: 389-93.

Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *Journal of cell science.* 2003;116(Pt 9):1827-35.

Harada, Y., y cols. Effect of *Escherichia coli*-produced recombinant human bone morphogenetic protein 2 on the regeneration of canine segmental ulnar defects. *J Bone Miner Metab.* 2012; 30(4): 388-399.

Hazama M, Aono A, Ueno N, Fujisawa Y. Efficient expression of a heterodimer of bone morphogenetic protein subunits using a baculovirus expression system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Apr 26;209(3):859-66.

Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol.* 1996;166:585–592.

Haynesworth SE, Goldberg VM, Caplan AI. Diminution of the number of mesenchymal stem cells as a cause for skeletal aging. En: Buckwalter JA, Goldberg VM, Woo SLY, editores. *Musculoskeletal Soft-Tissue Aging: Impact on Mobility.* Section 1, Chapter 7. Rosemont: AAOS, 1994. p. 80-6.

Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater.* 2005;4:518–524.

Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *Journal of cellular biochemistry.* 2006;99(5):1285-97.

Jäger M, Sager M, Lensing-Höhn S, Krauspe R. The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (II): implant evolution and surgical technique on a rat's femur. *Biomed Tech (Berl).* 2005 May;50(5):137-42.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of cellular biochemistry*. 1997;64(2):295-312.

Janssens K, ten Dijke P, Janssens S & Van Hul W. Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocrine Reviews* 2005 26 743–774.

Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental cell research*. 1998;238(1):265-72.

Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum*. 2002;46:3349–3360.

Katoh T, Sato K, Kawamura M, Iwata H y Miura T. Osteogenesis in sintered bone combined with bovine bone morphogenetic protein. *Clin Orthop*. 1993; 287: 266-275.

Nakahara H, Bruder SP, Haynesworth SE, Holecek JJ, Baber MA, Goldberg VM, et al. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone*. 1990;11(3):181-8.

Kim, D.H., Rhim, R., Li, L., Martha, J., Swaim, B.H., Banco, R.J. et al. Prospective study of iliac crest bone graft harvest site pain and morbidity. *J Spine*. 2009; 9: 886–892.

Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self- renewal and differentiation.2007; *Arthritis Res Therapy* 9:204, 1-10.

Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. 1997;*Br J Haematol* 97, 561-570.

Lin GL, Hankenson KD. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem*. 2011;112:3491–501

Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA, Mann KG. Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *J Clin Invest*. 1995 Feb;95(2):881-7. Erratum in: *J Clin Invest* 1995 Nov;96(5):2541.

Luu HH, Song WX, Luo X, Manning D, Luo J, Deng ZL, Sharff KA, Montag AG, Haydon RC, He TC. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 2007 May;25(5):665-77.

Mardon HJ, Bee J, Von der Mark K, Owen ME. Development of osteogenic tissue in diffusion chambers from early precursor cells in bone marrow of adult rats. *Cell Tissue Res* 1987; 250: 157-65.

Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica*. 2001;86(10):1099-100.

Mathavan, N., et al. (2013). Investigating the synergistic efficacy of BMP-7 and zoledronate on bone allografts using an open rat osteotomy model. *Bone* 56(2): 440-448.

Mehta H. Schell, C. Schwarz, A. Peters, K. Schmidt-Bleek, A. Ellinghaus. A 5-mm femoral defect in female but not in male rats leads to a reproducible atrophic non-union. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2011; 131 (2011), pp. 121–129.

Nishikawa M., Myoui A., Ohgushi H., Ikeuchi M., Tamai N., Yoshikawa H. Bone tissue engineering using novel interconnected porous hydroxyapatite ceramics combined with marrow mesenchymal cells: quantitative and three-dimensional image analysis. *Cell Transplant*. 2004;13:367–376.

Moroni A, Vannini F, Mosca M, et al. State of the art review: techniques to avoid pin loosening and infection in external fixation. *J Orthop Trauma* 2002; 16(3): 189–195.

Mroz TE, Joyce MJ, Steinmetz MP, Lieberman IH, Wang JC. Musculoskeletal allograft risks and recalls in the United States. *J Am Acad Orthop Surg*. 2008.Oct;16(10):559-65.

Nakahara H, Bruder SP, Haynesworth SE, Holecek JJ, Baber MA, Goldberg VM, et al. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone*. 1990;11(3):181-8. .

Nimni ME. Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. *Biomaterials*. 1997; 18:1201-1225.

Nishimura K, Solchaga LA, Caplan AI, Yoo JU, Goldberg VM, Johnstone B. Chondroprogenitor cells of synovial tissue. *Arthritis and rheumatism*. 1999;42(12):2631-7.

Ogushi H., Caplan AI Review Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999; 48A : 913-927.

Onishi T, Ishidou Y, Nagamine T, Yone K, Imamura T, Kato M, Sampath TK, ten Dijke P y Sakou T. () Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenetic protein (BMP) family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats. *Bone*. 1998; 22(6): 605-612.

Owen M. Linage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. En: Peck WA, editor. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. *Bone and Mineral Research*. 1985; 3: 1-25.

Park J, Gelse K, Frank S, von der Mark K, Aigner T, Schneider H. Transgene-activated mesenchymal cells for articular cartilage repair: a comparison of primary bone marrow-, perichondrium/periosteum- and fat-derived cells. *The journal of gene medicine*. 2006;8(1):112-25.

Percival CJ, Richtsmeier JT. Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. *Dev Dyn*. 2013 Aug;242(8):909-22.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143–147.

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997;276(5309):71-4.

Purpura KA, Aubin JE, Zandstra PW. Sustained in vitro expansion of bone progenitors is cell density dependent. *Stem Cells*. 2004;22(1):39-50.

Rao MS. Multipotent and restricted precursors in the central nervous system. 1999; *Anat Rec* 257, 137-148.

Rasini V, Dominici M, Kluba T, Siegel G, Lusenti G, Northoff H, et al. Mesenchymal stromal/stem cells markers in the human bone marrow. *Cytotherapy*. 2013.

Reilly GC, Radin S., Chen AT, Ducheyne P. diferenciales respuestas fosfatasa alcalina de rata y la médula ósea humana derivados de células madre mesenquimales de vidrio bioactivo 45S5. Biomateriales. 2007

Roy DM, Linnehan SA: Hydroxyapatite formed from coral skeleton carbonate by hydrothermal exchange. Nature 1974; 247: 220-227.

Ruppert R, Hoffmann E, Sebald W. Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. Eur J Biochem. 1996 Apr 1;237(1):295-302.

Sakellariou VI, Babis GC. Management bone loss of the proximal femur in revision hip arthroplasty: Update on reconstructive options. World J Orthop. 2014 Nov 18;5(5):614-22.

Shors EC: Coralline bone graft substitutes. Orthop Clin North Am 1999; 30:599-613.

Shu B, Zhang M, Xie R, et al. BMP2, but not BMP4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development. J Cell Sci. 2011;124(Pt 20):3428–3440.

Simmons PJ, Gronthos S, Zannettino A, Ohta S, Graves S. Isolation , characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hemopoiesis. 1984; Prog Clin Biol Res 389,271-280.

Soncini M, Vertua E, Gibelli L, Zorzi F, Denegri M, Albertini A, et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. Journal of tissue engineering and regenerative medicine. 2007;1(4):296-305.

Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating development and hormone-regulated expression of genes in osteoblasts: An integrated relationship of cell growth and differentiation. En: Noda M, editor. Cellular and Molecular Biology of Bone. San Diego: Academic Press, 1993; 47-95.

Takeshita S, Fumoto T, Matsuoka K, et al. Osteoclast-secreted CTHRC1 in the coupling of bone resorption to formation. J Clin Invest. 2013;123:3914–3924.

Tomford W. Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. J bone Joint Surg Am. 1995;77:1742-1754.

Trippel SB, Ghivizzani SC, Nixon AJ. Gene-based approaches for the repair of articular cartilage. *Gene therapy*. 2004;11(4):351-9.

Tsuchida H, Hashimoto J, Crawford E, Manske P, Lou J. Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats. *J Orthop Res*. 2003 Jan;21(1):44-53.

Tuan RS, Boland G, and Tuli R. Adult mesenchymal stem cell and cell-based tissue engineering. 2002 *Arthritis Research and Therapy* 5, 32-45.

Urist M.R., Bone: Formation by autoinduction, *Science*. 1965; 150: 893-899.

Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle & nerve*. 1995;18(12):1417-26.

Waller EK, Olweus J, Lund-Johansen F, Huang S, Nguyen M, Guo Gr, Terstappen L. The “common stem cell” hypothesis reevaluated: human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. 1995; *Blood* 85, 2422-2435.

Wang EA, Rosen V, Cordes P, Hewick RM, Kriz, MJ, Luxenberg DP. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85(24): 9484-9488.

Warzecha J, Seebach C, Flinspach A, Wenger F, Henrich D, Marzi I. Effect of sonic hedgehog/ β -TCP composites on bone healing within the critical-sized rat femoral defect. *Exp Ther Med*. 2013 Apr;5(4):1035-1039.

Welsch U. *Sobotta Histología*. 2014.

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 1988;242(4885):1528–1534.

Wrighton K. H., Lin X. & Feng X. H. Phospho-control of TGF- β superfamily signaling. *Cell. Res*. 19, 8–20 (2009).

Wynter EA, Emmerson AJ, Testa NG, Properties of peripheral blood and cord blood stem cells. 1999; *Baillière's Best Pract Res Clin Haematol* 12, 1-17.

Yang LJ, Jin Y. Immunohistochemical observations on bone morphogenetic protein in normal and abnormal conditions. Clin Orthop 1990; 257: 249-56.

Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, et al. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. The Journal of bone and joint surgery American volume. 1998;80(12):1745-57.

Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. The Anatomical record. 2001;264(1):51-62.

Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society. 2006;54(11):1177-91.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue engineering. 2001;7(2):211-28. Epub 2001/04/17.

Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. Arthritis research. 2000;2(6):477-88.

Capítulo VIII

8. ABREVIATURAS

Azul alciano-hematoxilina (AB-H)

Azul de toluidina (AT)

Beta-glicerolfosfato (β -GP)

Caracterización fenotípica por citometría de flujo (FACS, fluorescent activated cell sorted)

Célula madre adulta (ASC)

Célula madre hematopoyética (HSC)

Células trocanles mesenquimáticas (MSC)

Cámara de difusión (Dch)

Dexametasona (Dex)

Factores de crecimiento (Growth Factors, GFs)

Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)

Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)

Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)

Formalina neutra tamponada (BMF)

Fosfatasa alcalina (FA)

Hematoxilina-eosina (HE)

Hidroxiapatita (HA)

Laboratorio de Bioingeniería y regeneración de tejidos (LABRET)

Médula ósea (MO)

Osteocalcina (OC)

Período amplificación-inducción (PA-I)

Período de selección (PS)

Picrosirio (PS)

Proteína morfogenética ósea (BMP)

Proteína morfogenética ósea humana recombinante -2 (rhBMP-2)

Tricrómico de Goldner (TG)

Von Kossa (VK)

Capítulo IX

9. APÉNDICE

9. Procesamientos histológicos

9.1 Soluciones fijadoras

Solución fijadora Bouin (Baker 1946)

-Ácido pícrico en solución saturada.750 ml.

-Formaldehído comercial (30-40%).250 ml.

-Ácido acético glacial (100%) .50 ml.

Se debe filtrar antes de usar. La saturación del pícrico es aproximadamente de 13 gr/l, a 20°C.

Aplicado por inmersión, su tiempo de fijación fue de 24-48h a temperatura ambiente.

9.2 Inclusiones

En la inclusión de parafina, la duración de los pasos:

-Etanol 70°, 80°, 96°(*2) y 100°(*3)	1h en cada caso
-Tolueno (*2)	20 minuto
-Parafina I	4-6 h
-Parafina II	4-6 h
-Parafina III	18-24 h

Después se procede a la realización del bloque y se deja polimerizar la parafina a temperatura ambiente.

Las cámaras de MOD se orientan de forma que las paredes queden en la periferia del corte.

Tras la inclusión en parafina el tejido fue cortado en un microtomo en secciones de 10 µm. Posteriormente , las secciones destinadas a técnicas

histoquímicas se montan en portaobjetos tratados con poli-L-lisina., mientras que las destinadas a técnicas inmunohistoquímicas se montan en portaobjetos silanizados.

Los portaobjetos limpios y desengrasados se colocan en cestillas y cubetas de plástico que contienen una solución de poli-L-lisina 0.01% durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se dejan secar a 60°C durante 1h o a 37° durante 18-24 h.

Los portaobjetos silanizados se colocan en cestillas de metal y cubetas de cristal con solución al 2% de silano en acetona durante 2 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se lavan con agua destilada y se secan a 60°C durante 1h o a 37° durante 18-24 h.

9.3 Tinciones histológicas e histoquímicas

Los procesos de de desparafinación, hidratación y deshidratación-aclarado de las secciones, son comunes para todas las técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas:

Xileno	2*10 min
Alcohol 100°	10 min
Alcohol 100°	10 min
Alcohol 96°	5 min
Alcohol 70°	5 min
Agua destilada	5 min

9.3.1 Hematoxilina-eosina (HE)

Los cortes montados en portaobjetos se someten al siguiente tratamiento:

- Se desparafina e hidrata
- Tinción con hematoxilina de Harris 5 min
- Diferenciación con agua acética 1 min

- Agua corriente hasta que tomen un color azulado
- Tinción con eosina alcohólica 30 seg
- Diferenciación en alcohol de 96° con unas gotas de eosina
- Deshidratación:
 - Alcohol 96° 5 min
 - Alcohol 100° 5 min
 - Alcohol 100° 5 min
- Aclarado:
 - Xileno 10 min
 - Xileno 10 min

Solución de hematoxilina-eosina de Harris: hematoxilina 0,5%, alcohol absoluto 5%, alumbre potásico o férrico 10%, oxido de mercurio 0,25% en agua destilada.

Solución de eosina: Eosina 0,1%, ácido acético 0,5% en alcohol absoluto. Se diluye en el momento de su uso, con alcohol de 70° a partes iguales.

9.3.2 Azul de toluidina (AT)

- Se desparafina e hidrata
- Azul de toluidina 10 min
- Lavar en agua destilada, deshidratar y montar en Entellan

Solución de azul de toluidina: disolver 1 gr de colorante azul de toluidina, junto 1 gr de tatraborato sódico, en 100 ml de agua destilada.

9.3.3 Azul alciano (AB)

Preparación de la solución: disolver 1 gr de azul alciano 8GX en 100 ml de solución de ácido acético glacial al 3%. Ajustar el pH a 2.25 usando un tampón de fosfato sódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 7.6gr/100ml).

Protocolo de tinción:

- Se desparafina e hidrata
- Ácido acético al 3% 3 min
- Azul alciano 1 hora
- Lavar con agua corriente 10 min
- Lavar con agua destilada 5 min
- Hematoxilina de Mayer 1.5 min
- Lavar agua destilada, deshidratar y montar en Entellan

9.3.4 Picrosirio-hematoxilina de Mayer (PSH)

- Se desparafina e hidrata
- Picrosirio 1 hora
- Lavar con agua corriente 10 min
- Lavar con agua destilada 5 min
- Hematoxilina de Mayer 1.5 min
- Lavar agua destilada, deshidratar y montar en Entellan

Preparación del colorante: solución de Direct Red 80 al 02% en ácido pícrico saturado

9.3.5 Tricrómico de Goldner (TG)

- Se desparafina e hidrata
- Hematoxilina férrica 20 min
- Lavar en agua corriente 5 min
- Diferenciar en alcohol-acético 1 min
- Lavar en agua destilada 5 min
- Teñir con Fucsinade Ponceau. 45 min
- Lavar en agua corriente 5 min
- Sumergir brevemente en 1% de ácido acético
- Diferenciar en naranja G molibdato 13 min
- Lavar en agua corriente 5 min
- Sumergir en 1% de ácido acético
- Azul metilo 5 min
- Lavar en agua corriente 5 min
- Sumergir en 1% de ácido acético
- Lavar en agua destilada, deshidratar y montar la preparación con Entellan

9.3.6 Tinción con von Kossa (VK)

- Se desparafina e hidrata
- Nitrato de plata 5% expuesto a la luz de una bombilla de 100 W 1h
- Lavar en agua destilada 5 min
- Solución de tiosulfato sódico 5% 2 min
- Lavar en agua destilada 5 min
- Contrastar los núcleos con rojo nuclear 0.1% 5 min
- Lavar en agua destilada, deshidratar, y montar en Entellan

Preparación del colorante rojo nuclear: disolver 1 gr de colorante rojo nuclear en 100 ml de sulfato de aluminio al 5%.

9.4 Preparación de las muestras para citometría de flujo.

- Suspender 1×10^6 células en tampón FACS en un tubo de polipropileno de 12x75 mm.
- Lavar una vez en tampón FACS y centrifugar a 1200 rpm durante 5 min.
- Incubar con los anticuerpos conjugados a un fluorocromo, durante 30 min a 4 °C.
- Lavar en tampón FACS y centrifugar a 1200 rpm durante 5 min.
- Incubar con 7-amino-actinomicina D (7-AAD) durante 20 min a 4 °C, marcador de viabilidad usado para excluir las células muertas en los ensayos de citometría de flujo.

Procedimiento de análisis en el citómetro:

Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo MoFlo® SP1338 (DakoCytomation, Dinamarca) dotado de:

- Dos láseres: Coherent Enterprise II con dos picos de emisión, uno en 488 nm y otro entre 351 y 364 nm, y diodo rojo con pico de emisión en 635 nm.
- Un fotoreceptor para la luz transmitida (FS).
- Ocho fotomultiplicadores, uno de ellos para captar la luz dispersada (SS), y los otros siete para captar las distintas fluorescencias: tres para la luz azul, dos para la ultravioleta y dos para la roja.
- Boquillas para diferentes tamaños de partículas o células, 50, 70, 100, 200 y 400 micras.

- Dispensador de muestra totalmente automatizado, Smart Sampler, con posibilidad de usar tubos de 0.5 ml, 1.5 ml, 5 ml base redonda, 14 ml base redonda, 15 ml base cónica o 50 ml base cónica.
- Separación celular hasta en 4 vías simultáneamente.
- Aplicación para calibración de la separación, Cyclone.
- Aplicación para control automático de la separación, Sort Master.
- Posibilidad de hacer la separación tanto en tubo como en portas o placas multipocillos.
- Programa para visualización de los datos Summit v. 4.0.

Se analizaron un mínimo de 50.000 eventos viables. Los datos fueron adquiridos en forma de histogramas mono y biparamétricos. El posterior análisis de los datos, utilizando el programa Summit v. 4.0, se aprovechó para recombinar los parámetros obtenidos y redefinir diferentes regiones de selección.

El porcentaje de células positivas fue determinado tomando como referencia la tinción no específica con anticuerpos del mismo isotipo.

9.5 Preparación de las cámaras de DBM

- Lavar con dH₂O con ayuda de una jeringuilla.
- Etanol 95° (x2, 15 min.) a 4 °C.
- Etanol 100° (x2, 15 min.) a 4 °C.
- Éter (x2, 15 min.), para eliminar el agua y desengrasar.
- Dejar evaporar el éter. En este punto se pueden almacenar a -20 °C.
- Ácido clorhídrico 0.6 N (100 ml/g) a 4 °C y en agitación, hasta que las diáfisis estén traslúcidas y flexibles (18 horas aproximadamente).
- Lavar con dH₂O durante 2 días a 4 °C y en agitación, con 3 cambios diarios, para eliminar los restos de ácido clorhídrico.
- Cortar según el tamaño deseado.

- Etanol 100° (x2, 10 min.) para esterilizar.
- Lavar con medio estéril (α -MEM o solución salina) para eliminar el etanol.
- Dejar secar bajo la campana o en un liofilizador.
- Armar con filtros 0.45 μ m de poro.
- Guardar a 4 °C.

Capítulo X

10. PUBLICACIONES/COMUNICACIONES Y PATENTE



ADULT STEM CELLS APPLIED TO TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE

M.D. CUENCA-LÓPEZ¹, P. ZAMORA-NAVAS², J.M. GARCÍA-HERRERA³, M. GODINO³,
J.M. LÓPEZ-PUERTAS⁴, E. GUERADO³, J. BECERRA¹ AND J.A. ANDRADES^{1*}

¹Department of Cell Biology, Genetic and Physiology, Laboratory of Bioengineering and Tissue Regeneration. Faculty of Sciences, University of Málaga, 29071 Málaga, Spain

²Department of Orthopaedic Surgery. University Hospital Virgen de la Victoria, 29010 Málaga, Spain

³Department of Orthopaedic Surgery. Hospital Costa del Sol, 29603 Marbella (Málaga), Spain

⁴Department of Orthopaedic Surgery. Hospital Juan Ramón Jiménez, 21005 Huelva, Spain

* José A. Andrades, Ph.D. Department of Cell Biology, Genetic and Physiology/Faculty of Sciences, University of Málaga 29071 – Málaga, Spain

Telephone: (34) 952 131872 Fax: (34) 952 131937 E-mail: andrades@uma.es

Received September 1st, 2008; Accepted October 16th, 2008; Published October 26th, 2008

Abstract – Regeneration takes place in the body at a moment or another throughout life. Bone, cartilage, and tendons (the key components of the structure and articulation in the body) have a limited capacity for self-repair and, after traumatic injury or disease, the regenerative power of adult tissue is often insufficient. When organs or tissues are irreparably damaged, they may be replaced by an artificial device or by a donor organ. However, the number of available donor organs is considerably limited. Generation of tissue-engineered replacement organs by extracting stem cells from the patient, growing them and modifying them in clinical conditions after re-introduction in the body represents an ideal source for corrective treatment. Mesenchymal stem cells (MSCs) are the multipotential progenitors that give rise to skeletal cells, vascular smooth muscle cells, muscle (skeletal and cardiac muscle), adipocytes (fat tissue) and hematopoietic (blood)-supportive stromal cells. MSCs are found in multiple connective tissues, in adult bone marrow, skeletal muscles and fat pads. The wide representation in adult tissues may be related to the existence of a circulating blood pool or that MSCs are associated to the vascular system.

Key words: Stem cell; Cell therapy; Tissue engineering; Regenerative medicine; Chondrogenesis; Osteogenesis.

INTRODUCTION

Stem cells (SCs), whether derived from embryos, fetuses, or adults, seem poised to dominate the next frontier of human regenerative medicine and cellular therapy. Over the last 15 years, major advances have been made in the

isolation, the culture and the induction of differentiation of SCs from various sources. SCs have now been identified in every major tissue and organ of the human body. Concomitant with these discoveries intense efforts are made to understand the molecular mechanisms underlying the decision of SCs being in mitotic dormancy, to undergo self-renewal, or to differentiate terminally. An understanding of these molecular mechanisms would help realize the tremendous therapeutic potential of SCs.

To this end, state-of-the-art technologies have been developed to interrogate genome-wide gene expression in SCs in an effort to establish the cause-effect relationship between the biological states of SCs and the molecular signatures that they manifest. Recent studies

Abbreviations: ADSC, adipose-tissue-derived stem cell; BM, bone marrow; EPC, endothelial progenitor cell; ESC, embryonic stem cell; HSC, hematopoietic stem cell; MAPC, multipotent adult progenitor cell; MSC, mesenchymal stem cell; NSC, neural stem cell; PCL, polycaprolactone; PLLA, poly L-lactic acid; SC, stem cell; TE, tissue engineering.

Osteogénesis terapéutica en cirugía del raquis.

Bases científicas de la artrodesis vertebral.

II: fundamentos biológicos

E. Guerado Parra^a, M. Godino Izquierdo^a, J. Andrades Gómez^b y J. Becerra Ratia^b

^aServicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología. Hospital Costa del Sol. Departamento de Cirugía.

Universidad de Málaga. Marbella. Málaga. ^bDepartamento de Biología Celular y Fisiología. Universidad de Málaga. Málaga.

Introducción. Una artrodesis sobre raquis tiene dos pasos claramente diferenciados: la colocación de un sistema de fijación y la adición de una sustancia osteogénica, generalmente tejido óseo, que pretende estimular la formación de hueso entre los niveles deseados.

Biología molecular de las BMP. Las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) participan en la multiplicación, diferenciación, muerte programada (apoptosis) y morfogénesis.

Sustitutos óseos. El sustituto óseo ideal siempre ha sido el injerto autólogo, que provee células vivas del propio individuo y factores de crecimiento (FC), además de hueso propiamente dicho. Todos los nuevos sustitutos que han ido apareciendo deben cumplir con las condiciones fundamentales del autoinjerto, pero no con sus inconvenientes, entre los que se encuentran la morbilidad de la zona donante y la cantidad limitada de la que se dispone.

Factores de crecimiento. Aunque actualmente existen publicaciones donde se muestra que la administración de FC en la artrodesis vertebral estimula la osteogénesis, se desconoce la forma de administración con relación a la dosis, transportadores o momento de administrar cada factor.

Terapia génica. La ingeniería genética, aun siendo una apuesta de futuro interesante, necesita todavía mucho camino para ser una realidad en la aplicación para la promoción de la osteogénesis terapéutica.

Palabras clave: raquis, cirugía, osteogénesis, biología.

Therapeutic osteogenesis in spinal surgery. Scientific basis of vertebral fusion. II: Biological principles

Introduction. Spinal fusion has two clearly differentiated steps: a fixation system and addition of an osteogenic substance, generally bone tissue, intended to stimulate bone formation between levels.

Molecular biology of BMP. BMPs participate in multiplication, differentiation, programmed death (apoptosis), and morphogenesis.

Bone substitutes. The ideal bone substitute has always been an autologous graft, which supplies living cells and GF from the host, in addition to bone. Any new substitute should meet the basic conditions of an autograft without its drawbacks, which include damage to the harvest area and a limited harvest.

Growth factors. Although it has been reported that the administration of growth factors stimulates osteogenesis during spinal fusion, the specifics of administration such as optimal dose and suitable transporters and timing are unknown for each factor.

Gene therapy. Genetic engineering, although an important option for the future, still requires work to become a reality in therapeutic osteogenesis.

Key words: spine, surgery, osteogenesis, biology.

El objetivo de cualquier osteosíntesis sobre el raquis consiste en propiciar las condiciones estáticas adecuadas hasta que se forme hueso, el cual se estimula mediante la

aportación de las sustancias osteogénicas que se añaden durante la cirugía. Así pues una artrodesis sobre raquis tiene dos pasos claramente diferenciados: la colocación de un sistema de fijación y la adición de una sustancia osteogénica, generalmente tejido óseo, que pretende estimular la formación de hueso entre los niveles deseados.

El tejido óseo tiene unas funciones esenciales en la homeostasis del calcio y otros electrolitos; el hueso, como órgano, constituye una combinación de numerosos tipos celu-

Correspondencia:

E. Guerado Parra.
Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología.
Hospital Costa del Sol. Universidad de Málaga.
29600. Marbella (Málaga).
correo electrónico: eguerado@hcs.es

Capítulos de libros

-Título del libro: Injertos, sustitutivos óseos y materiales en la cirugía reconstructiva del aparato locomotor. Fundación SECOT. Salamanca 2005.

Capítulo: Mesengénesis en cirugía protésica de revisión.

Autores: **Godino Izquierdo M.**, Guerado Parra E., Andrade Gómez JA.

Congresos

Autores: **Godino Izquierdo, M.**

Título: Mesengénesis en cirugía de revisión endoprotésica.

Tipo de participación: Ponencia Oral

Congreso: Curso básico SECOT.Biomateriales .

Lugar de celebración: Salamanca

Fecha: 2005

Autores: **Godino M.**, Guerado E, Becerra J, Andrades JA

Título: Capacitación de células osteogénicas *in vitro* y resecciones óseas segmentarias: una estrategia novedosa para la cirugía ortopédica

Tipo de participación: Comunicación Oral

Congreso: X Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular

Lugar de celebración: Santander (España)

Fecha: 2003

Autores: **Godino M**, Andrades JA, Becerra J, Guerado E

Título: Resección segmentaria del fémur de rata. Estudio de terapia celular

Tipo de participación: Ponencia Oral

Congreso: 41 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología (SECOT)

Lugar de celebración: Madrid (España)

Fecha: 2004

Autores: Andrades JA, Claros S, **Godino M**, Gómez-Pérez L, Alonso M, Guerado E, Becerra J

Título: Células madre mesenquimáticas capacitadas *in vitro* para promoción de osteogénesis terapéutica

Tipo de participación: Comunicación Oral

Congreso: 14 Congreso Científico Internacional

Lugar de celebración: La Habana (Cuba)

Fecha: 2005

